

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química-Física Aplicada
Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación



**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE VEHÍCULOS LIPÍDICOS BASADOS
EN ALQUILGLICEROL**

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ALKYLGLYCEROL-BASED
DELIVERY SYSTEMS**

PABLO ARRANZ MARTÍNEZ

Tesis Doctoral

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, UAM-CSIC)



Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos

Madrid, febrero de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química-Física Aplicada
Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE VEHÍCULOS LIPÍDICOS BASADOS
EN ALQUILGLICEROL**

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ALKYLGLYCEROL-BASED
DELIVERY SYSTEMS**

Memoria presentada por:

PABLO ARRANZ MARTÍNEZ

Para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Mención Internacional

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Carlos F. Torres Olivares

Dr. Luis Vázquez de Frutos

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, UAM-CSIC)



Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Guillermo Reglero por haberme permitido formar parte de este proyecto y comenzar así mi carrera científica dentro del Grupo de Investigación en Ciencias de la Alimentación de la Universidad Autónoma de Madrid. La labor que has desempeñado durante tantos años ha permitido que hoy día nuestro ámbito de investigación esté en constante crecimiento, tanto científico como personal.

Cómo no, agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Carlos Torres y el Dr. Luis Vázquez, por acompañarme a lo largo de estos años, y por depositar su confianza desde que me abriesen las puertas del laboratorio para hacer el trabajo de Fin de Máster. Por sus consejos, por compartir su experiencia y por transmitir esa pasión por la ciencia. Por esas conversaciones improvisadas, debatiendo ideas y propuestas, donde tanto se aprende. Y por supuesto, por su amistad.

Al resto de personal del departamento, porque siempre han contado con el tiempo y la disposición para cualquier necesidad. Quiero hacer una especial mención a la Dra. Tiziana Fornari, por su cercanía y atención tanto en sus funciones de Coordinadora del Doctorado como Directora del CIAL.

A todo el personal del CIAL, que hace posible que una entidad como esta siga creciendo: investigadores y técnicos, órganos de dirección y gestión, administración e informática, y por supuesto, a los responsables de limpieza y mantenimiento.

A los compañeros que han ido pasando por el laboratorio durante estos años, Marta, Elvira, Mario, Celia, Jennifer, Elena, Lalo, Víctor, Christian...gracias por compartir vuestro tiempo además de vuestro trabajo, y por llenar el laboratorio de vida.

Y a los que habéis compartido mesa en el atrio durante la comida. Habéis pasado muchos por ahí, Alba, Cris, Pili, Pila, Carlos, Tomás, Dani, Javi, Alberto...y os puedo asegurar que todos los almuerzos han sido de buen provecho a vuestro lado.

A todos los compañeros de la UAM, porque cada vez que he subido a vuestra planta me he contagiado de vuestro buen ambiente.

Al Dr. Alejandro Marangoni por aceptar la invitación y dejarme aprender en su laboratorio. Gracias por el entusiasmo que transmites con cada resultado, así nunca se quitan las ganas de seguir investigando. De mi estancia en Canadá no puedo olvidarme de Fernanda y

de Jorge, que consiguieron llenar de calor nuestra casa e hicieron que los días allá fuesen menos fríos.

Son muchas las personas que también han sido de gran ayuda durante estos años fuera del laboratorio.

A mis amigos, mis sponsors, a los que estáis en el barrio y los que habéis marchado un poco más lejos, ya sabéis que sin vosotros y sin vuestros impuestos este “trabajo” no podría haber sido posible. Gracias por esa relación que nos une desde la adolescencia, y que espero perdure en el tiempo, haciéndose más fuerte cada día. A tope de power chipi flower.

Y siempre que hay que dar las gracias, la familia merece un lugar especial.

A mis padres, literalmente por todo. Porque en la vida siempre necesitamos faros que alumbren el camino, y vosotros lleváis haciéndolo ya más de treinta años. Porque os admiro, y porque vuestra capacidad de lucha y superación hacia la constante mejora resulta motivacional.

A mi hermano Julio y a mi cuñada María. Un 27 de Agosto os lo dije, y hoy me reafirmo. Gracias por inspirarme con el maravilloso tándem que formáis. Julio, no dejes de ser fuente de inspiración con esa carcajada que siempre consigues sacarnos.

A mi hermana Elena. Lo tuyo es especial. Siempre tienes la palabra adecuada para levantar el ánimo, para recobrar las fuerzas perdidas. Esa fuerza que sin embargo tú nunca pierdes. Eres un ejemplo a seguir en el camino *Hacia la meta*, con o sin *zapasilla*.

Y las últimas líneas van dedicadas a alguien que ya se ha mencionado en este texto, pero que merece un agradecimiento especial. Al poco de comenzar esta Tesis, comenzó también nuestro camino juntos, y tu compañía ha sido trascendental durante estos años. Marta, eres un referente dentro y sobre todo fuera del laboratorio. Sin duda me quedo con la vitalidad que desprendes, tu constante sonrisa, tu ilusión y tu fuerza de voluntad. Gracias por contagiarme un poquito de todo eso y hacerme mejor persona a tu lado.

Qué bonita palabra,

GRACIAS

Pablo

Madrid, febrero de 2018



La presente Tesis Doctoral se ha realizado gracias a la financiación del contrato pre-doctoral del Ministerio de Economía y Competitividad y del Fondo Social Europeo (BES-2014-070395), enmarcado dentro del proyecto de investigación “Formulación de productos para la nutrición personalizada de enfermos de cáncer gástrico”, dentro del Programa de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad, con número de proyecto AGL2013-48943-C2-1-R

ÍNDICE

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	I
Resumen.....	III
Summary.....	V
Estructura de la memoria.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Éteres lipídicos o alquilgliceroles.....	3
1.1.1. <i>Estructura química</i>	3
1.1.2. <i>Propiedades biológicas de los alquilgliceroles</i>	5
1.1.3. <i>Digestibilidad de los alquilgliceroles</i>	7
1.2. Sistemas de vehiculización lipídica de compuestos bioactivos.....	7
1.2.1. <i>Sistemas de vehiculización químicos</i>	9
1.2.2. <i>Sistemas de vehiculización físicos</i>	12
1.2.2.1. <i>Sistemas vesiculares</i>	15
1.2.2.2. <i>Nanopartículas lipídicas</i>	17
1.2.2.3. <i>Emulsiones</i>	18
1.3. Modificación enzimática de lípidos.....	23
1.3.1. <i>Reacciones catalizadas por lipasas</i>	24
1.3.1.1. <i>Reacciones de glicérolisis enzimática</i>	27
1.3.1.2. <i>Especificidad de las lipasas</i>	28
1.3.2. <i>Reacciones catalizadas por fosfolipasas</i>	29
1.3.2.1. <i>Reacciones de transfosfatidilación</i>	31
1.3.3. <i>Inactivación enzimática</i>	32
1.3.4. <i>Cinéticas enzimáticas</i>	33
1.4. Comportamiento cristalino y caracterización de sistemas lipídicos.....	34
1.4.1. <i>Comportamiento cristalino en medios hidrófobos</i>	35
1.4.2. <i>Comportamiento cristalino en medios hidrófilos</i>	38
1.4.3. <i>Técnicas de caracterización física</i>	41
1.4.3.1. <i>Calorimetría diferencia de barrido</i>	41

1.4.3.2. Difracción de Rayos X.....	43
1.4.3.3. Técnicas de imagen microcópica.....	44
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo general.....	47
2.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	47
3. RESULTADOS.....	49
3.1. Producción de un vehículo lipídico bioactivo a partir de la glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón <i>quimera</i>.....	51
3.2. Glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón <i>quimera</i> en un reactor de tipo tanque agitado: una estimación cinética.....	65
3.3. Influencia del procesado térmico en el comportamiento cristalino de un nuevo sistema de vehiculización lipídica compuesto por acil- y alquilglicéridos.....	75
3.4. Producción de un nuevo éter fosfolipídico mediante transfosfatidilación sólido-sólido en presencia de fosfolipasa D de grado alimentario.....	101
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	115
4.1. Desarrollo de un vehículo lipídico a partir de aceite de hígado de tiburón <i>quimera</i>.....	118
4.2. Desarrollo de un vehículo lipídico a partir de alquilglicerol libre.....	125
4.3. Sugerencias para futuras investigaciones.....	127
5. CONCLUSIONES.....	129
6. BIBLIOGRAFÍA.....	135

Lista de Abreviaturas

AF: Ácido fosfatídico

AG: Ácido graso

AGPI: Ácido graso poliinsaturado

AGL: Ácido graso libre

AKG: Alquilglicerol

AKGL: Alquilglicerol libre

CLA: Ácido linoleico conjugado

CLN: Complejos lipídicos nanoestructurados

DAG: Diacilglicerol o diglicérido

DAKG: Alquilglicerol diesterificado

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

FC: Fosfatidilcolina

FL: Fosfolípido

FLA1: Fosfolipasa A1

FLA2: Fosfolipasa A2

FLC: Fosfolipasa C

FLD: Fosfolipasa D

GRAS: Generalmente reconocido como seguro

MAG: Monoacilglicerol o monoglicérido

MAKG: Alquilglicerol monoesterificado

ME: Microemulsiones

NE: Nanoemulsiones

NLS: Nanopartículas lipídicas sólidas

PLM: Microscopía de luz polarizada

SAE: Sistemas autoemulsionables

SAXS: Difracción de rayos X en ángulos pequeños

SMAE: Sistemas micro-autoemulsionables

SNAE: Sistemas nano-autoemulsionables

TAG: Triacilglicerol o triglicérido

T_c: Temperatura de cristalización

T_f: Temperatura de fusión

T_{oc}: Temperatura de inicio de cristalización

T_{of}: Temperatura de inicio de fusión

WAXS: Difracción de rayos X en ángulos grandes

XRD: Difracción de rayos X

RESUMEN

Resumen

En los últimos años, se han descubierto numerosos ingredientes bioactivos con prometedores efectos como potenciales agentes terapéuticos. Sin embargo, esta actividad, que ha sido demostrada en ensayos *in vitro*, no siempre ha mostrado los mismos resultados cuando se han llevado a cabo ensayos *in vivo*. Esto puede ser debido a que estos compuestos, en muchas ocasiones con carácter lipófilo, pueden tener una baja estabilidad durante la digestión gástrica, que deriva en una precipitación o una degradación de los mismos. En consecuencia, esta falta de bioactividad puede estar relacionada con una baja bioaccesibilidad y biodisponibilidad en el organismo.

Con el fin de mejorar la absorción de estos compuestos bioactivos, se han desarrollado numerosas estrategias, entre las que se encuentra el uso de vehículos lipídicos. Si bien la función de estos sistemas lipídicos es el transporte y protección de dichos compuestos bioactivos durante el proceso digestivo, adicionalmente, con el fin de proporcionar un valor añadido a estos vehículos, se plantea la posibilidad de utilizar aceites con propiedades bioactivas complementarias a las del ingrediente bioactivo vehiculizado.

Los estudios realizados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, han tenido como objetivo el desarrollo de vehículos lipídicos compuestos por alquilglicerol. El interés por el uso de estas moléculas se debe a sus propiedades anticancerígenas, antineoplásicas e inmunomoduladoras entre otras. No obstante, hay que remarcar que estos compuestos tienen un bajo grado de digestibilidad, debido a la presencia de un enlace éter, lo que supone un punto clave a la hora de desarrollar estos vehículos. Así pues, se han diseñado dos líneas de trabajo.

En primer lugar, se ha optimizado el proceso de glicerolisis enzimática de un aceite de hígado de tiburón *quimera*, con un contenido en alquilglicerol diesterificado del 80%. Bajo las condiciones óptimas de reacción (40 °C, en presencia de la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada como biocatalizador, relación molar aceite:glicerina 1:1 y el uso de 67% (p/p) de ciclopentanona como medio de reacción), se ha conseguido obtener un producto final con un contenido en monoglicérido superior al 30%, lo que le confiere potenciales propiedades autoemulsionables.

Este proceso ha sido fácilmente escalable a planta piloto, obteniendo tasas de conversión similares a las conseguidas a nivel laboratorio. La reutilización del biocatalizador

en consecutivos ciclos de reacción en planta piloto ha permitido el estudio cinético de la reacción de glicerolisis de este aceite. De este modo, se ha calculado la tasa de conversión de cada una de las especies presentes en el medio de reacción, observando que la velocidad de desaparición del triglicérido es 1.5 veces superior a la de alquilglicerol diesterificado, lo que demuestra que el biocatalizador utilizado presenta una discriminación hacia la conversión del éter lipídico. Adicionalmente, se ha estimado la vida media de dicha lipasa en 145 h bajo las condiciones de reacción estudiadas.

El producto obtenido a partir de la reacción de glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera*, ha mostrado un comportamiento cristalino hasta 45 °C, atribuido a la presencia de la fracción de monoglicérido. El estudio de distintos tratamientos térmicos mostró una influencia sobre las cinéticas de cristalización y la estabilidad polimórfica del producto de glicerolisis.

Por último, el planteamiento de una estrategia adicional para el empleo de alquilglicerol en formulaciones lipídicas condujo a la modificación de una fosfatidilcolina comercial con una molécula de alquilglicerol, concretamente el batil alcohol, mediante una reacción transfosfatidilación, catalizada por la fosfolipasa D. La optimización de las condiciones de reacción permitió la obtención de un nuevo fosfolípido, el fosfatidilbatil alcohol, con una pureza superior al 70%, con potenciales propiedades bioactivas en su uso como vehículo lipídico.

Summary

Over the last years, a number of bioactive compounds from natural sources have shown promising effects as potential therapeutic/preventive agents in several *in vitro* assays but they do not provide the same efficacy when they are tested *in vivo*, which reduce their clinical use. The reason is related to the lipophilic properties of most of these compounds, which leads to instability during gastric digestion, reducing the intestinal bioaccessibility, bioavailability and, hence, the bioactivity or bioefficiency.

Many strategies have been developed in order to enhance the absorption of these molecules. Among them, association to lipids has gained much interest. The main purpose of these lipid-based carriers is the transportation and protection of the bioactive compound throughout the gastrointestinal tract. Nevertheless, the use of lipids with bioactive properties might confer an additional value to the delivery system.

The main goal of the studies carried out during this Doctoral Thesis has been the development of alkylglycerol-based delivery systems. The particular interest in the use of these molecules is the bioactive properties reported, such as antiproliferative, anticarcinogenic and immunomodulatory. However, the alkyl residue affects significantly their digestibility, which limits their capacity to act as lipid carriers. This highlights the need of strategies that improves the digestibility, miscibility and emulsifying capacity of these lipids. Therefore, two lines of research have been implemented.

Firstly, the enzymatic glycerolysis of *ratfish* liver oil, composed of 80% of diacylglyceryl ether, has been optimized. Under optimal conditions, i.e. 40 °C, 67% (w/w) of cyclopentanone as solvent, a molar ratio RLO to glycerol of 1:1, in the presence of immobilized lipase *Candida antarctica* as biocatalyst, the process led to a final product composed of more than 30% of monoglyceride, and hence, with potential emulsifying properties.

This process has been easily scaled-up to pilot plant, without significant differences in reaction kinetics compared to results obtained at laboratory scale. Reutilization of same batch of enzyme allowed the study of the kinetics of the glycerolysis reaction of this oil. Positive discrimination against diacylglyceryl ether was accurately determined, establishing that glycerolysis of triglyceride occurred 1.5 times faster compared to that of diacylglyceryl ether.

Additionally, under the reaction conditions studied, the half-life of the biocatalyst was approximately 145 h.

The product obtained upon the glycerolysis reaction of *ratfish* liver oil, has shown a crystalline behavior up to 45 °C, mainly due to the presence of the newly synthesized monoglyceride. The influence of the thermal processing at 50 °C on the subsequent phase behavior of the product has been investigated, revealing that the duration of the treatment has an impact in the crystallization kinetics and the polymorphic stability.

Lastly, enzymatic transphosphatidylation between commercial phosphatidylcholine and an alkylglycerol, namely batyl alcohol, in the presence of phospholipase D as biocatalyst, has been studied as an additional strategy to obtain alkylglycerol-based delivery systems. Optimization of the process led to the synthesis of a novel phospholipid, named phosphatidylbatyl alcohol, with a purity higher than 70%, with potential bioactive properties in its use as lipid delivery system.

Estructura de la memoria

El procedimiento relativo al tribunal, defensa y evaluación de la tesis doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid, aprobado en Consejo de Gobierno el 3 de febrero de 2012, permite presentar la tesis doctoral como un compendio de publicaciones. Para ello se requiere un mínimo de 3 artículos publicados o admitidos para su publicación en revistas científicas de reconocido prestigio o en libros editados de importancia justificada. La memoria del trabajo de Tesis Doctoral debe incluir una introducción general que presente los trabajos compendiados, justifique la temática y explique la aportación original del autor, así como un resumen global de los resultados obtenidos, de la discusión de éstos y de las conclusiones finales. Se ha de incluir una copia completa de los mencionados trabajos.

La memoria de la presente investigación de Tesis Doctoral responde a los requisitos anteriormente descritos y está estructurada en seis secciones. Dentro del apartado de resultados y discusión, se han incorporado cuatro artículos científicos realizados en torno al desarrollo y caracterización de vehículos lipídicos basados en alquilglicerol y que han sido publicados en revistas de difusión científica internacional.

Introducción, presentación de los fundamentos y antecedentes correspondientes a los trabajos realizados en la presente Tesis.

Objetivos, planteamiento de las hipótesis de trabajo, así como los objetivos generales y específicos de esta memoria, descripción de la metodología y los procedimientos aplicados.

Resultados, presentación de los resultados obtenidos según cuatro artículos publicados, con el esquema convencional de las publicaciones científicas.

Discusión, se presenta una explicación general del trabajo de Tesis que integra todos los trabajos publicados.

Conclusiones, presentación de las conclusiones generales y más relevantes obtenidas en los trabajos expuestos y discutidos en las secciones anteriores.

Bibliografía, utilizada en la presente memoria.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Éteres lipídicos o alquilglicerol

1.1.1. Estructura química

El conjunto de lípidos que contienen un enlace éter en su estructura se denominan éteres lipídicos. Dentro de esta categoría, se enmarcan los 1-O-alkil-2,3-*sn*-glicerol, o alquilglicerol (AKGs) y los 1-O-alkenil-2,3-*sn*-glicerol o plasmalógenos neutros. Al igual que los derivados acilglicerol, estos compuestos se caracterizan por presentar en su estructura una molécula de glicerina, en la que los grupos hidroxilo pueden estar total o parcialmente esterificados. La principal diferencia radica en la sustitución de un enlace éster por un enlace éter en la posición *sn*-1 (Figura 1).

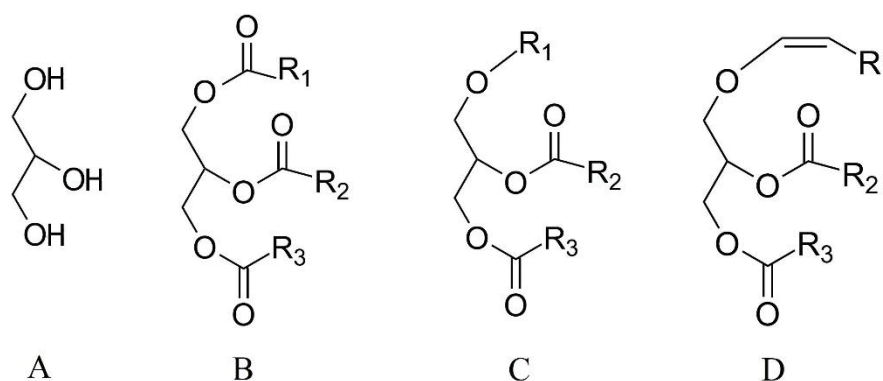


Figura 1. Diferencias estructurales entre las moléculas de triglicéridos y AKGs. Glicerina (A), Triglicérido (B), AKG (C), Plasmalógeno neutro (D).

En función del grado de sustitución de las posiciones *sn*-2 y *sn*-3, los AKGs se pueden dividir en AKG libre (AKGL), AKG monoesterificado (MAKG), o AKG diesterificado (DAKG) (Figura 2). Las principales cadenas alquílicas presentes en la fracción 1-O-alkil de los AKGLs son los residuos hexadecil (C16:0), octadecil (C18:0) y octadec-9-enil (C18:1), denominados chimil-, batil- y selachil- alcohol respectivamente (Figura 3) [1].

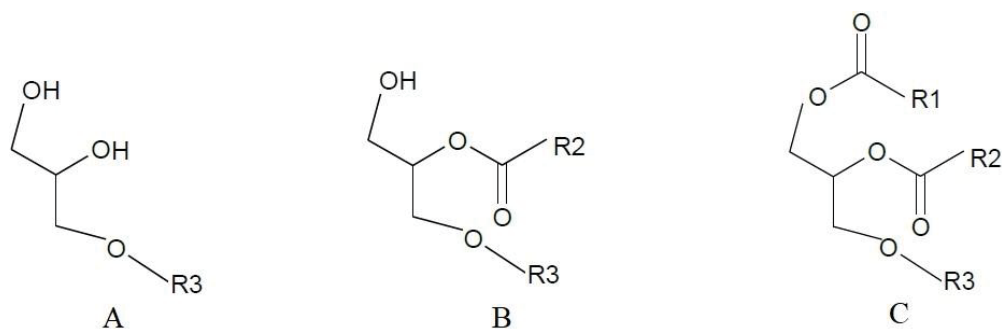


Figura 2. Estructuras químicas de AKGL (A), MAKG (B) y DAKG (C).

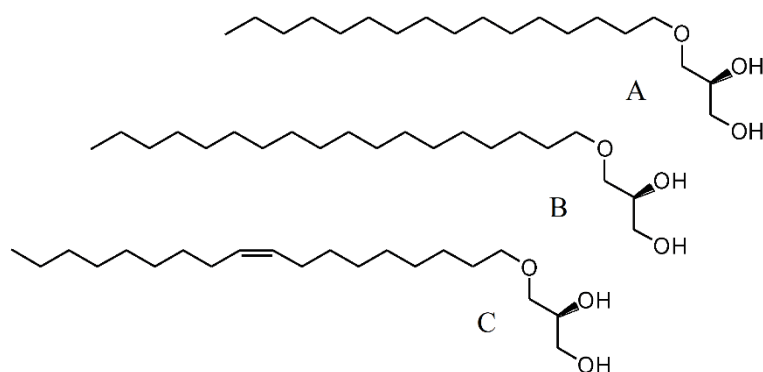


Figura 3. Principales tipos de AKGs. Chimil Alcohol (A), Batil Alcohol (B), Selachil Alcohol (C).

Adicionalmente, el enlace éster de la posición *sn*-3 puede estar reemplazado por un enlace fosfodiéster con la correspondiente cabeza polar, que da lugar a los éteres fosfolipídicos, moléculas análogas a los fosfolípidos (FLs) derivados de los acilglicerol (Figura 4).

Estos derivados lipídicos están presentes en bajas concentraciones en todos los tejidos, especialmente en aquellos portadores de células inmunitarias como el hígado, el bazo, los glóbulos rojos, los ganglios linfáticos y la médula ósea [2], y es especialmente remarcable su presencia en la leche materna [3]. No obstante, la principal fuente de obtención natural de AKGs es el aceite de hígado de tiburón y otras especies de elasmobranquios [4], entre los que podemos destacar el tiburón *quimera* (*Hydrolagus colliei*). Se trata de una especie ancestral poco estudiada que habita en las zonas más profundas de los océanos, cuyo esqueleto es

cartilaginoso, y el hígado puede llegar a abarcar el 60-80% de su peso, lo que lo sitúa como una excelente fuente para la obtención de aceite rico en AKGs debido a la elevada productividad en el proceso de obtención. Cabe destacar además que, a diferencia de otros aceites de origen marino, el aceite de hígado de tiburón *quimera* presenta un perfil lipídico con una composición en ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) inferior al 20%, lo que le confiere una potencial mayor estabilidad frente a procesos oxidativos [5].

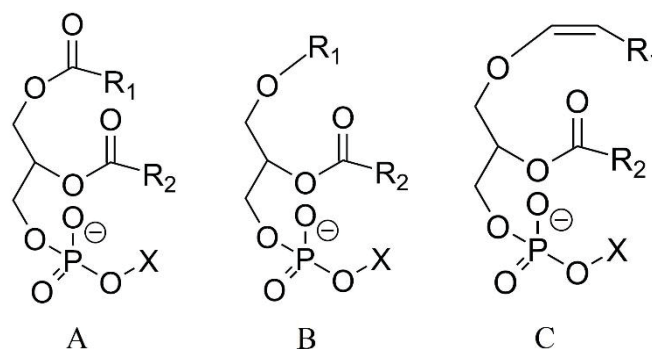


Figura 4. Principales diferencias estructurales entre los derivados fosforilados. FL (A), Plasmanil FL (B), Plasmalógenos (C).

1.1.2. Propiedades biológicas de los AKGs

El interés en estas moléculas recae en las distintas propiedades bioactivas que han sido descritas durante los últimos años. Desde hace más de 40 años, el aceite de hígado de tiburón ha sido utilizado como agente terapéutico y preventivo de ciertas enfermedades. Los AKGs tienen una estructura similar al factor de activación de plaquetas, descrito como uno de los intermediarios lipídicos con mayor bioactividad [1], implicado en prevención de enfermedades como el asma, la psoriasis, la artritis y la eliminación rápida de metales pesados, así como en procesos inflamatorios, de desarrollo neuronal y procesos de reproducción [6].

La administración de AKGs ha demostrado tener efectos antineoplásicos, reduciendo el desarrollo, crecimiento y proliferación de células tumorales, sin mostrar efectos citotóxicos [7, 8]. Además, la ingesta de AKGs en pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia, puede reducir sus efectos secundarios, como la leucopenia, trombocitopenia y fistulas [9, 10]. Recientes estudios han demostrado que la caquexia, una sintomatología de malestar vinculada con enfermedades degenerativas y cáncer, puede reducirse tras la ingesta de AKGs [11, 12].

Existe una relación entre los AKGs y la potenciación del sistema inmune, ya que estos compuestos estimulan la producción de interleucinas IL-12 [13] e IL-2 [14], relacionadas con los sistemas de repuesta Th1, promoviendo así la activación de linfocitos B, mientras que los niveles de IL-4 e IL-10, relacionados con la activación de respuestas Th2, responsable de las reacciones alérgicas, se reducen [15], además de aumentar los niveles de C1q [16]. En personas de avanzada edad, la ingesta de AKGs previa a intervenciones quirúrgicas da lugar a un incremento de los niveles de leucocitos, linfocitos, IgM e IgA en el período postoperatorio [17]. Adicionalmente, la suplementación en AKGs en la dieta de mamíferos gestantes y lactantes, induce efectos beneficiosos en el sistema inmunológico de los recién nacidos, con niveles más altos de IgG, eritrocitos y hemoglobina en sangre [18, 19].

Por otro lado, los AKGs de cadena corta tienen la habilidad de incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica [20-22], permitiendo el paso de moléculas de interés a través de ella, incluso siendo éstas de alto peso molecular, como albúminas y anticuerpos [20, 23]. La apertura de estos canales por la acción de los AKGs es breve, reversible y no afecta a las uniones estrechas [24].

Un estudio reciente demostró que los AKGs con AGPIs pueden promover una reducción en la obesidad debida a dietas altas en grasas y mejorar la resistencia a la insulina en ratas [25]. Asimismo, la administración oral de AKGs en pacientes obesos puede reducir los niveles totales de colesterol, asociado con un mayor riesgo de síndrome metabólico [26].

El tratamiento *in vitro* de espermatozoides con AKGs mejora su motilidad y su fertilidad en su uso en inseminaciones [27] y la velocidad del espermatozoide también se mejora tras la ingesta de AKGs [28].

Otras propiedades atribuidas a los AKGs son la actividad antiviral [29, 30], antibacteriana [31], y la inhibición del transporte de toxinas desde el *Golgi* al retículo endoplásmico [32].

No obstante, cabe destacar que la posible actividad biológica reportada para los AKGs está supeditada al grado de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los mismos, estrechamente ligado a la digestibilidad de estas moléculas.

1.1.3. Digestibilidad de los AKGs

El residuo *O*-alquil de la posición *sn*-1 de los AKGs supone una pequeña diferencia estructural con respecto a los análogos acilglicéridos. Sin embargo, esta diferencia afecta significativamente al grado de digestibilidad de los AKGs, especialmente si nos referimos a los derivados esterificados DAKG y MAKG. Martín y col. [33] compararon el grado de digestibilidad entre triglicéridos (TAGs) y DAKGs, observando que, tras un proceso de digestión *in vitro*, el grado de inclusión de AKGs como producto final de la hidrólisis en la fase micelar o fase bioaccesible, era más limitada en comparación con los productos finales de la digestión de TAGs, como consecuencia de su baja digestibilidad. La resistencia de DAKG a la hidrólisis por acción de la lipasa pancreática también fue observada por Sato y col. [34].

Una posible solución a esta limitación sería desarrollar mezclas de AKGs predigeridas para la obtención de mezclas lipídicas biocompatibles, es decir, con una composición similar a la de los productos finales de la digestión gastrointestinal, que permitan la correcta bioactividad de estos compuestos a nivel plasmático. De manera alternativa, otra posibilidad sería la unión de estas moléculas con propiedades bioactivas a otras que permitan aumentar su bioaccesibilidad, como podría ser el caso de los FLs.

1.2. Sistemas de vehiculización lipídica de compuestos bioactivos

La bioactividad de una sustancia está determinada por su bioaccesibilidad a nivel gastrointestinal tras su ingesta (medida como la cantidad de extracto soluble en el intestino, y por tanto, disponible para ser absorbido), así como de su biodisponibilidad (capacidad para ser absorbido por las células intestinales y llegar a las células u órganos diana). Este aspecto es importante hasta el punto de que determinados compuestos que han mostrado efectos prometedores en ensayos *in vitro*, presentan falta de efecto bioactivo en estudios clínicos debido a su baja biodisponibilidad [35]. Ésta puede deberse a: i) una baja solubilidad en agua del compuesto, lo que puede limitar su solubilización luminal y disolución en el tracto gastrointestinal [36]; ii) una baja estabilidad en el medio ácido del estómago, pudiendo precipitar durante la digestión gástrica limitando, por tanto, su bioaccesibilidad; y/o iii) una escasa liposolubilidad, lo que dificulta su absorción por las células intestinales [37].

En este sentido, el sistema de clasificación biofarmacéutica (Figura 5), propuesto en 2002 por Yu y col. [38], permite diferenciar los fármacos de acuerdo a sus propiedades de

solubilidad y permeabilidad, con el fin de establecer sus potenciales propiedades de absorción tras su ingesta. Esta clasificación también puede aplicarse al ámbito alimentario y nutracéutico. Así, con el fin de poder incluirse dentro de la clase I, la ideal en términos de biodisponibilidad, los compuestos bioactivos enmarcados dentro de las clases III y IV deben ser optimizados para mejorar su permeabilidad, mientras que aquellos categorizados dentro de la clase II pueden mejorar su solubilidad mediante técnicas de formulación.

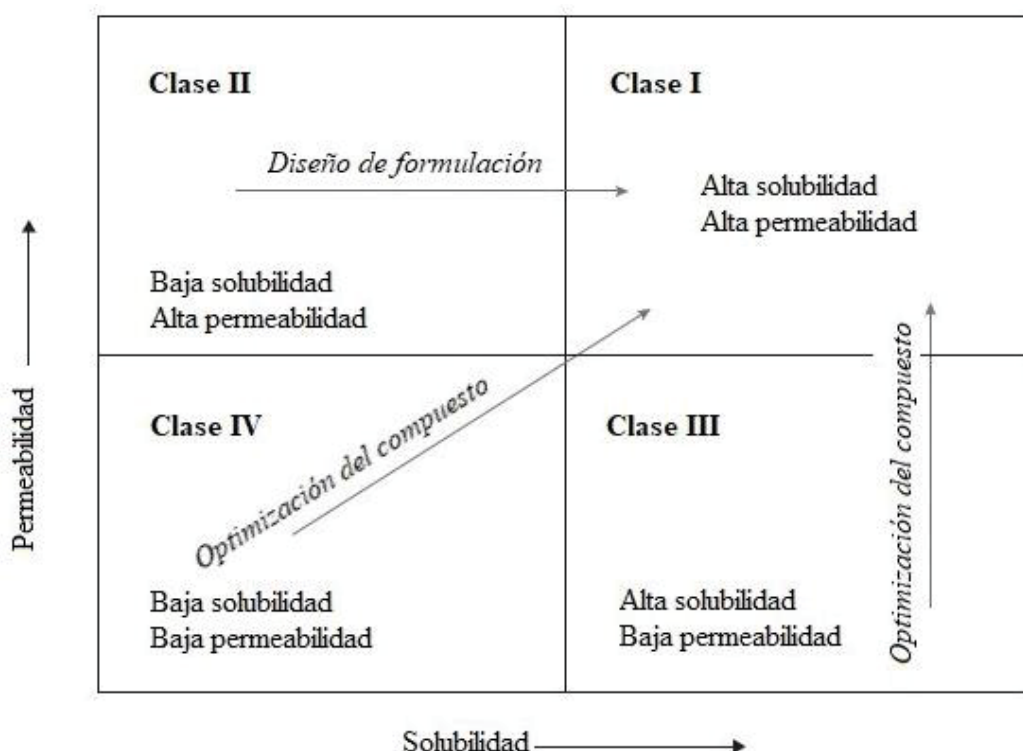


Figura 5. Sistema de clasificación biofarmacéutica. Los distintos compuestos bioactivos se clasifican en función de su solubilidad y permeabilidad [38].

Estas premisas han promovido el planteamiento del desarrollo de sistemas portadores para la introducción eficiente de compuestos bioactivos con carácter lipófilo o baja solubilidad en agua en determinadas matrices alimentarias, y para la vehiculización de determinados lípidos bioactivos a través de la sangre. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada en el campo farmacéutico, pero también puede aplicarse para nutracéuticos y alimentos funcionales [39].

En este sentido, el modo de vehiculizar los compuestos de interés se puede realizar mediante interacciones químicas entre el vehículo lipídico y el compuesto bioactivo, que forma parte de la estructura de lípido vehiculizante, o mediante interacciones físicas, en las que se transporta el compuesto bioactivo mediante la formación de emulsiones lipídicas, microionización, nanopartículas o dispersiones sólidas [40].

1.2.1. Sistemas de vehiculización químicos

En relación con los sistemas de vehiculización químicos, los TAGs han sido una de las moléculas más utilizadas para formar lípidos estructurados [41]. Los lípidos estructurados presentan una distribución posicional modificada de manera que AGs de interés, como ácido linoleico conjugado (CLA) [42] o AGPIs de cadena larga [43, 44], se encuentran esterificados en la posición *sn*-2, favoreciendo así su absorción e incorporación al sistema linfático tras la hidrólisis de la lipasa pancreática. Otros compuestos esterificados en la estructura del glicerol pueden ser compuestos fenólicos como el ácido ferúlico [45], y mezclas de compuestos antioxidantes como ácido carotenoico, y trolox, un derivado de la vitamina E [46]. Glicéridos menores como monoacilglicerol (MAG) también se han utilizado para la incorporación al esqueleto de glicerina de ácidos fenólicos como el ácido cafeico [47].

Asimismo, estructuras similares a los TAGs pueden servir como sustrato para la vehiculización de compuestos bioactivos. Torres y col. [48] estudiaron el proceso combinado de saponificación y reesterificación enzimática de AKGs con CLA y ácido eicosapentaenoico, interesados en estudiar posteriormente la combinación de la bioactividad tanto del compuesto vehiculizante como del vehiculizado [49]. Más adelante, este mismo grupo, sintetizó enzimáticamente un DAKG donde las posiciones *sn*-2 y *sn*-3 se encontraban esterificadas con ácido butírico [50], demostrando que tras un proceso digestivo *in vitro*, su actividad antiproliferativa se incrementaba hasta cuatro veces, debido principalmente a un efecto sinérgico entre los compuestos derivados de la digestión [51]. Otro ejemplo del uso de éteres lipídicos como sistemas de vehiculización fue desarrollado por Madrona y col. [52], que sintetizaron un nuevo grupo de compuestos denominados hidroxitirosol-alquil-éteres, cuya biodisponibilidad fue comprobada posteriormente [53], afirmando que estos compuestos mostraban un eficiente grado de absorción por las células epiteliales.

Por otro lado, los FLs, debido a su carácter anfifílico, también han sido objeto de estudio como lípidos portadores. Los FLs son componentes mayoritarios de las membranas celulares y

tienen un papel crucial en la bioquímica y fisiología de las células. El metabolismo digestivo de los FLs tras su ingesta tiene lugar en el intestino, mediante la acción de la enzima fosfolipasa A2 (FLA2), que actúa sobre el AG esterificado en la posición *sn*-2, dando lugar al liso-FL y al ácido graso libre (AGL) correspondientes, que son incorporados al lumen intestinal [54]. De este modo, los FLs pueden actuar como portadores de compuestos bioactivos mediante la incorporación de éstos en la posición *sn*-1 o *sn*-2.

Existen numerosas investigaciones en este sentido, incorporando AGs de interés como AGPIs omega-3 [55], ácido linoleico [56] o ácido eicosapentaenoico [57], en la posición *sn*-1, lo que podría ayudar a reducir los niveles de lípidos en sangre o a la inhibición de células tumorales [58, 59] o en la *sn*-2, que podría facilitar el transporte de estos AGs hacia el cerebro [60]. AGs de cadena corta como el ácido butírico también han sido objeto de interesterificación en FLs [61]. Miyamoto y col. [62] desarrollaron un éster de fosfato con vitamina E, con el cual se pretendió mejorar la actividad antioxidante de esta vitamina gracias a la forma de vehiculización. Recientemente, Balakrishna y col. [63] evaluaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de distintos ácidos fenólicos esterificados en la posición *sn*-1 de la fosfatidilcolina (FC), observando resultados prometedores. La conveniencia de esterificar el compuesto bioactivo en la posición *sn*-1 del FL también fue observada por Gliszczyńska y col. [64], que evaluaron la actividad antiproliferativa de nuevos FLs esterificados con ácidos monoterpénicos, concretamente ácidos geránico y citronélico, dando lugar a un incremento en dicha actividad respecto a los ácidos monoterpénicos libres.

Alternativamente, mediante la reacción enzimática de transfosfatidilación, que consiste en el intercambio del residuo unido al fosfórico de la cabeza polar de un FL por un compuesto con un grupo hidroxilo mediante la acción de la fosfolipasa D (FLD) [65], se pueden incorporar compuestos bioactivos que cumplan con dicho requisito. De este modo, podemos obtener moléculas que tengan un alto grado de reconocimiento celular y permitan la entrada del compuesto bioactivo al interior de la célula con mayor facilidad. Adicionalmente, una nueva línea de investigación, denominada terapia de sustitución lipídica, sugiere el uso de lípidos de membrana, principalmente FLs, para modular y regular numerosas funciones de la membrana [66]. Yamamoto y col. [67] comprobaron que los derivados fosfatidilizados de los alcoholes monoterpénicos perilílico, mirtenol, nerol y geraniol presentaron una relevante actividad antiproliferativa, mientras que dicha actividad fue nula cuando se evaluó en los alcoholes libres. Más tarde, Casado y col. [68] vehiculizaron la molécula de tirosol, un compuesto fenólico con propiedades antioxidantes, e hidroxitirosol [69], obteniendo los derivados fosfatidiltirosol y

fosfatidilhidroxitirosol. En un estudio para medir la actividad antioxidante frente a procesos de peroxidación lipídica en matrices alimentarias, se observó que la actividad del derivado fosfatidilizado del hidroxitirosol resultó ser mayor que el compuesto sin lipofilizar [70]. Posteriormente, se evaluó el grado de digestibilidad, bioaccesibilidad y actividad antioxidante *in vitro* de este mismo compuesto [71], estableciéndose que la bioaccesibilidad de esta molécula era comparable a la del FL de referencia, y que el producto de digestión de este nuevo compuesto presentaba una actividad antioxidante mayor que el producto sin digerir.

La reacción de transfosfatidilación también ha sido utilizada en el caso de vitaminas y sus derivados. El ácido L-ascórbico, un antioxidante hidrosoluble, se encuentra habitualmente liofilizado como palmitato ascórbico. Sin embargo, Nagao y col. [72] propusieron una alternativa mediante su unión al residuo fosfórico de la FC, dotándole así de una mayor actividad antioxidante que el ácido ascórbico libre. Basados en estos resultados, más adelante ese mismo grupo vehiculizó un derivado del α -tocoferol o vitamina E, el anillo de cromanol, dando lugar al fosfatidilcromanol [73]. Este nuevo compuesto reportó una mayor afinidad con los FLs de las membranas y una mayor actividad antioxidante que el α -tocoferol, orientada hacia la estabilidad oxidativa de grasas [74]. Otros ejemplos de vitaminas que también han sido utilizadas como sustrato de este tipo de reacciones son la tiamina, la piridoxina, la riboflavina y el ácido pantoténico [75, 76].

Además de los FLs y de los derivados glicéricos, la esterificación con AGLs o alcoholes grasos también ha sido utilizada como estrategia para la vehiculización de compuestos bioactivos. El hidroxitirosol y sus derivados también han sido objeto de esterificación con AGLs y ésteres de AGs, dando lugar a más de 40 derivados con carácter lipófilo [77]. La esterificación de otros compuestos fenólicos como isoflavonas les dota de un carácter lipófilo suficiente para facilitar su incorporación a las estructuras de las lipoproteínas de baja densidad e incrementar su resistencia a la oxidación [78]. El ácido rosmarínico, un ácido polifenólico relacionado con la prevención de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, tiene una mayor capacidad para neutralizar radicales libres cuando se encuentra esterificado con un AG [79].

El grupo de los esteroides vegetales o fitosteroides, además de tener un gran interés por sus propiedades relacionadas con su capacidad hipocolesterolémica, anticancerígena, antiinflamatoria y antioxidante [80], también ha sido estudiado para el transporte de compuestos bioactivos. Si bien la esterificación de estos compuestos es aconsejable para

mejorar su actividad biológica, esta unión se puede llevar a cabo además con compuestos con propiedades funcionales, como es el caso de AGPI de cadena larga [81] o CLA [82].

1.2.2. Sistemas de vehiculización físicos

A diferencia de los sistemas de vehiculización químicos explicados en el apartado anterior, en los sistemas de vehiculización físicos el compuesto bioactivo no forma parte de la estructura química de las moléculas del vehículo, sino que se encuentra disperso o disuelto en el mismo, pudiendo establecer interacciones moleculares débiles, tipo Van der Waals. En la Figura 6 se presenta una clasificación que incluye las formulaciones más recientes, y se destacan en cursiva aquellas orientadas a su administración vía oral [83].

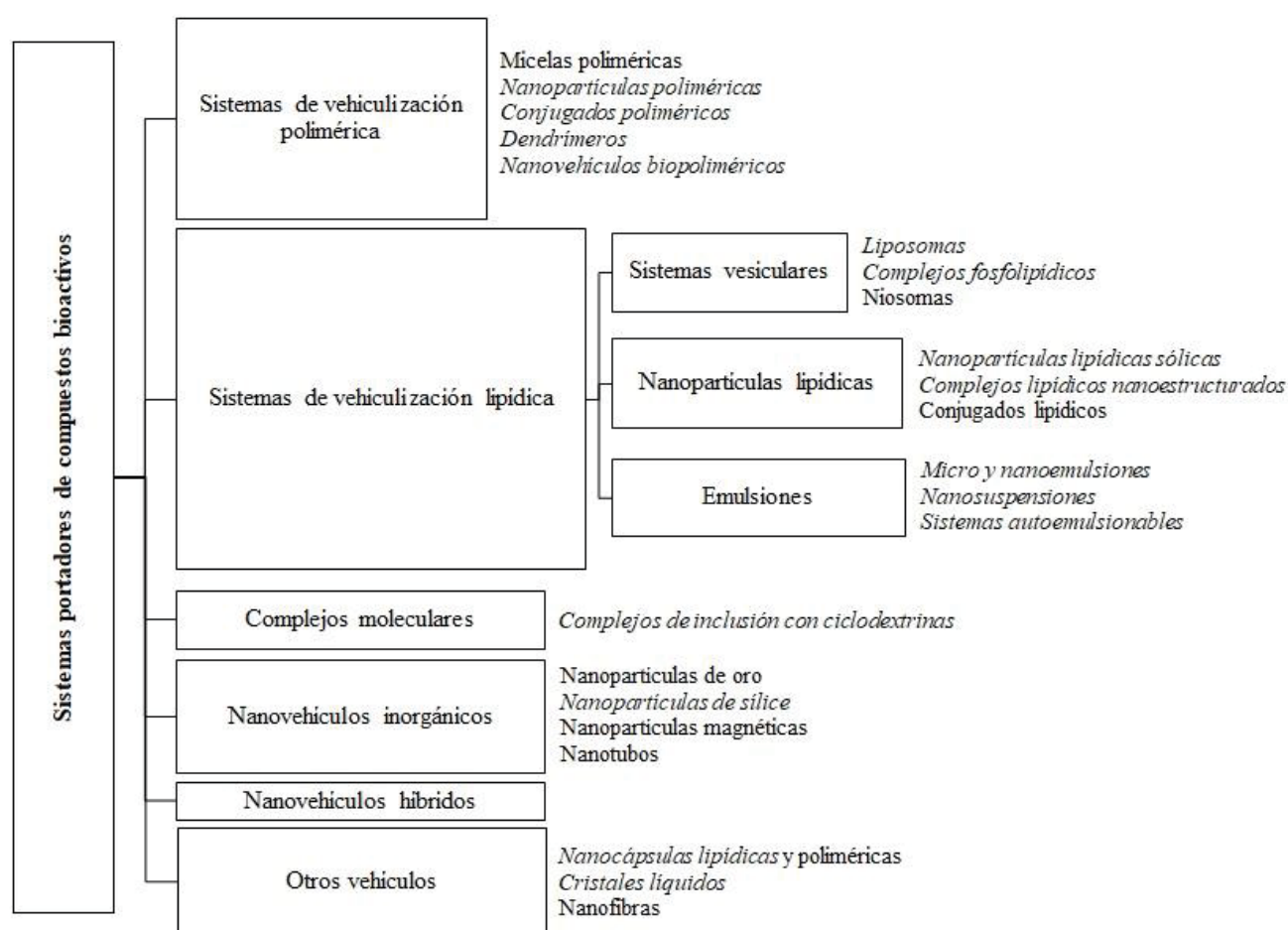


Figura 6. Clasificación de los distintos sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos para mejorar su eficacia. Aquellos desarrollados para su administración oral están señalados en letra cursiva.

Durante los últimos años, se han buscado nuevas estrategias de formulación para abordar la falta de eficacia clínica de algunos compuestos bioactivos debido a su escasa solubilidad en medios acuosos. Las formulaciones basadas en lípidos han presentado un especial interés en comparación con otras formulaciones para su uso en administración oral de compuestos poco solubles en medios acuosos por las siguientes razones [84, 85]:

- i) Mejor biocompatibilidad y biodegradación.
- ii) Mayor versatilidad para abordar los requisitos especiales en cuanto a estabilidad de la molécula, toxicidad y eficacia, así como la vía de administración y coste económico.
- iii) Capacidad de carga alta.
- iv) Estabilidad farmacéutica.
- v) Capacidad de dosificación controlada del compuesto.
- vi) Métodos de preparación sencillos y fácilmente escalables.
- vii) Riesgo bajo de efectos secundarios.

El propósito de los vehículos lipídicos es mejorar la absorción gastrointestinal y la biodisponibilidad oral del compuesto bioactivo, y su mecanismo de acción se describe en la Figura 7 [83, 86]:

(1) Tras la administración oral de la formulación con el compuesto bioactivo, y una vez alcanzado el entorno acuoso del estómago, la lipasa gástrica comienza la digestión de las formulaciones lipídicas. A su vez, los movimientos peristálticos del estómago facilitan la dispersión de los excipientes lipídicos en pequeñas gotas. De esta manera, se acelera el proceso de solubilización del compuesto bioactivo en la matriz lipídica, lo que mantiene al compuesto bioactivo en disolución durante un período prolongado, evitando la precipitación y protegiéndolo del pH ácido del estómago y la degradación enzimática y/o química del tracto gastrointestinal.

(2) Ya en el intestino delgado, la presencia de compuestos lipídicos estimula la segregación de bilis y jugos pancreáticos. La lipasa pancreática hidroliza los TAGs en AGLs, MAGs y diacilglicerol (DAGs) que sufren procesos de hidratación y autoensamblaje que dan lugar a la generación de estructuras cristalinas líquidas en las interfases oleosas. La dispersión de estos cristales líquidos en los fluidos intestinales produce distintas estructuras, con fases cúbicas, lamelares o hexagonales, todas ellas con diferente capacidad de carga. Los productos de la digestión, junto con las sales biliares y los FLs de la vesícula biliar, forman vesículas, micelas

y micelas mixtas. Estas estructuras coloidales favorecen la solubilización y transporte del compuesto bioactivo hasta la zona de absorción, protegiéndolo de la microbiota intestinal y de la degradación enzimática, alargando su tiempo de residencia y favoreciendo una distribución uniforme a lo largo del tracto gastrointestinal, que minimiza la irritación de la pared duodenal debida al contacto directo con el compuesto bioactivo.

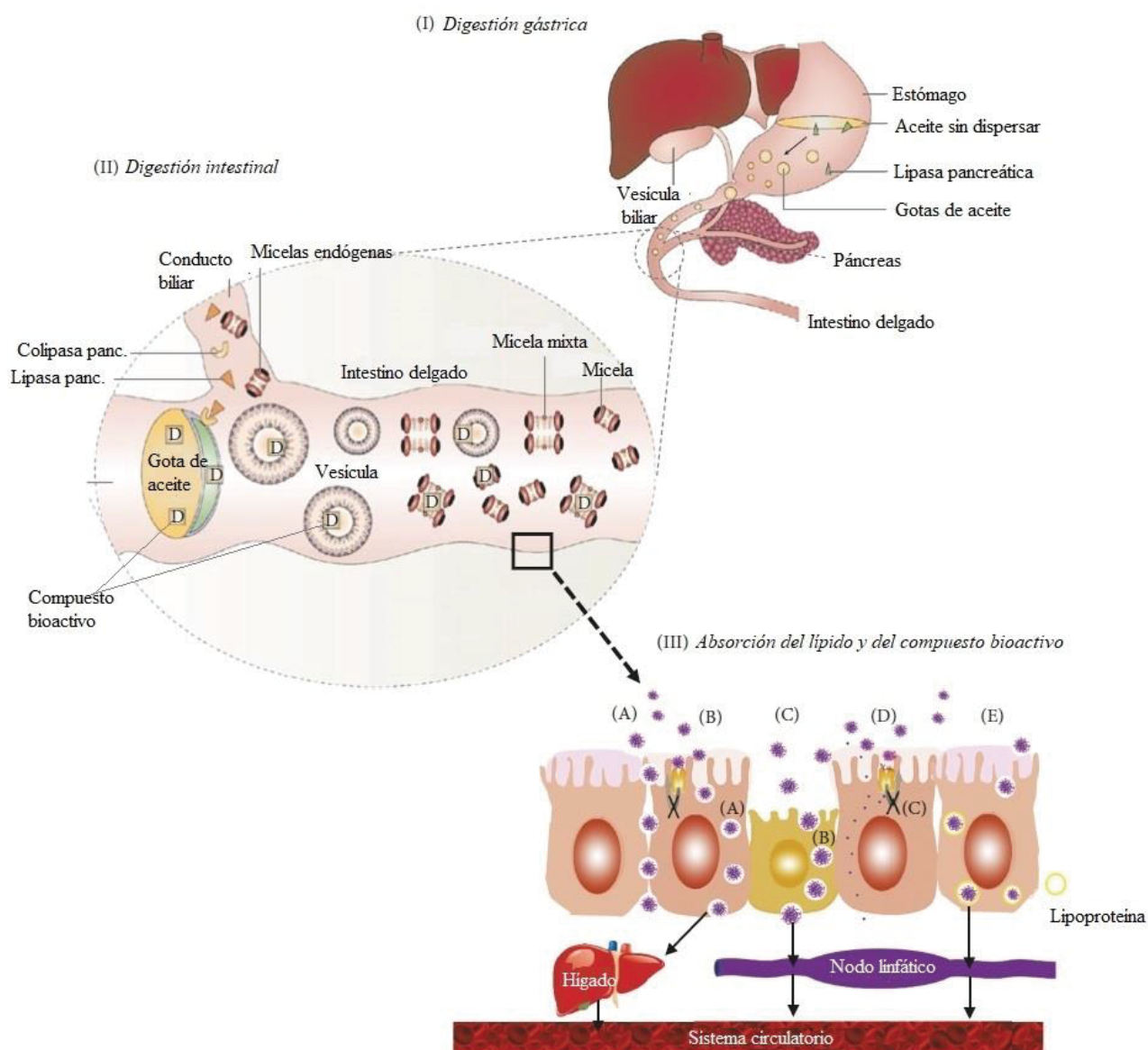


Figura 7. Mecanismo de acción de los vehículos lipídicos en la mejora de la bioeficiencia del compuesto bioactivo transportado [83].

(3) La formación de estos sistemas coloidales mejora la absorción intestinal de los compuestos bioactivos mediante distintos mecanismos: (i) mejorando el transporte paracelular mediante la apertura de las uniones estrechas; (ii) aumentando la fluidez de la membrana, que facilita la absorción transcelular; (iii) promocionando la fagocitosis por células especializadas; (iv) incrementando la concentración intracelular y el tiempo de residencia mediante la inhibición de glicoproteínas de transporte; (v) estimulando la producción de lipoproteínas y quilomicrones, que reaccionan con el compuesto bioactivo y lo transportan al sistema linfático.

Por estas razones, y considerando la temática de la presente Tesis, a continuación se detallan los últimos avances en el desarrollo de sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos basados en lípidos.

1.2.2.1. Sistemas vesiculares

(i) **Liposomas.** Se tratan de vesículas esféricas con una membrana compuesta de una o varias bicapas de FLs. El carácter anfifílico de los FLs facilita la ordenación de estas moléculas de tal manera que en medios acuosos, las cabezas polares se orientan hacia el exterior de la estructura, y las colas hidrofóbicas se sitúan en el interior. Al ordenarse como una bicapa, permite la inclusión de moléculas tanto de carácter hidrófilo como lipófilo. De acuerdo a las dimensiones de los liposomas, pueden clasificarse en tres categorías [87]: vesículas unilamelares pequeñas; vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares [88].

Las principales ventajas en el uso de liposomas para la vehiculización de compuestos bioactivos radican en que i) mejora su solubilidad y estabilidad; ii) evita la precipitación gástrica y la degradación temprana en el intestino; iii) minimiza los efectos secundarios. Sin embargo, los liposomas convencionales presentan una baja estabilidad en el sistema circulatorio y un reducido tiempo de residencia, relacionado con la eficacia de la liberación del compuesto bioactivo, que hace que se busquen modificaciones alternativas [89].

Entre las modificaciones más comunes, está la inclusión de colesterol o de polietilenglicol a la superficie del liposoma (Figura 8), lo que le confiere de una estabilización estérica, consiguiendo disminuir la fluidez de la membrana y permeabilidad, obteniendo así una posterior estabilización *in vivo*. La modificación estructural también puede ir dirigida a la unión de distintos tipos de ligandos (anticuerpos, péptidos y carbohidratos) a la superficie del liposoma o a las moléculas de polietilenglicol [90, 91].

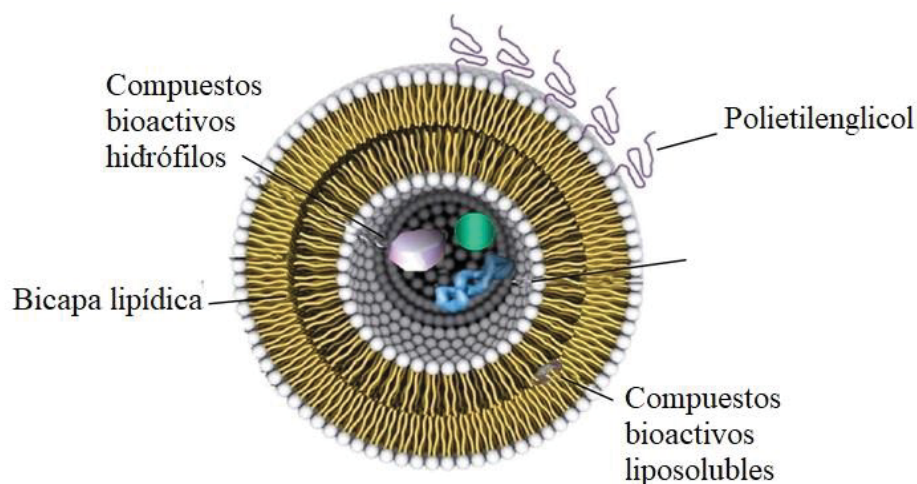


Figura 8. Estructura tridimensional de un liposoma [92]

Alternativamente, se ha planteado el uso de unas estructuras similares a los liposomas denominadas arqueosomas. Estas estructuras están formadas por la combinación de FLs y tetraéteres lipídicos saturados, que se pueden extraer de microorganismos pertenecientes al reino de las arqueobacterias. La presencia de los enlaces éter dentro de la estructura vesicular les confiere de una mayor estabilidad térmica, hidrolítica y frente a la acción de fosfolipasas, una mayor resistencia a pH ácido, y una reducción en la fluidez de la membrana, lo que conlleva a un mayor empaquetamiento, sin necesidad de añadir colesterol (Figura 9) [93]. Sin embargo, la obtención de estos compuestos puede resultar un inconveniente debido a la dificultad para obtenerlos a partir de fuentes naturales [94].

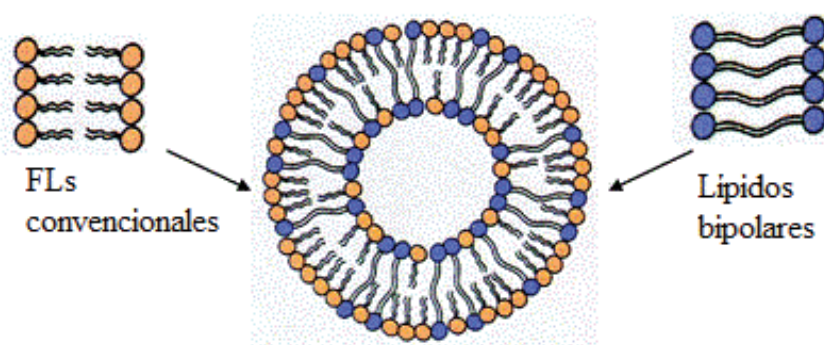


Figura 9. Representación de los arqueosomas. Los tetraéteres lipídicos se alternan con los fosfolípidos convencionales dotando de mayor rigidez y estabilidad a la estructura [94].

(ii) **Complejos fosfolipídicos (fitosomas).** Estas estructuras, al igual que los liposomas, se componen de vesículas esféricas con una membrana bicapa en la que las cabezas hidrofílicas están expuestas hacia el medio acuoso, mientras que las colas hidrofóbicas se mantienen juntas en el interior. Sin embargo, a diferencia de los liposomas, el compuesto bioactivo no se localiza en el núcleo acuoso, sino que se enlaza al extremo polar del FL mediante interacciones químicas débiles, mientras que la fase apolar queda libre (Figura 10). Esta combinación de fitoquímico y FL, generalmente en proporciones 1:1 o 1:2 (p:p) resulta en una estructura altamente biocompatible y biodisponible debido a un aumento de la permeabilidad del fitoquímico, que alcanza el torrente sanguíneo con mayor facilidad y de manera controlada, con un mayor tiempo de residencia [95, 96].

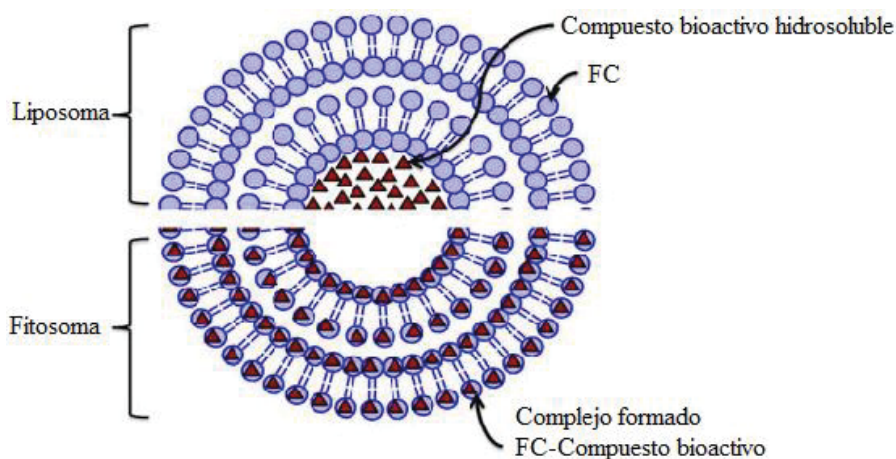


Figura 10. Representación gráfica de las principales diferencias estructurales entre liposomas y fitosomas, donde el compuesto bioactivo se une a las cabezas polares de los FLs mediante interacciones covalentes débiles [97].

1.2.2.2. Nanopartículas lipídicas

Al igual que los sistemas vesiculares, se tratan de estructuras esféricas, con un tamaño comprendido entre 40 y 1000 nm, sin embargo, el estado físico de estas formulaciones es sólido. En los últimos años, estos sistemas portadores han despertado gran interés debido principalmente a que se tratan de una alternativa económica y su producción, fácilmente escalable, se desarrolla en ausencia de disolventes orgánicos [98, 99]. Además, las nanopartículas lipídicas presentan beneficios tales como alta estabilidad física, versatilidad química y la protección del compuesto vehiculizado de procesos de degradación y oxidativos [100].

(i) **Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)**: Están constituidas por sólidos lipídicos con propiedades biocompatibles, biodegradables y generalmente reconocidos como seguros (GRAS), como por ejemplo TAGs, AGs o esteroides [101]. Presentan las ventajas de las nanopartículas lipídicas descritas anteriormente, sin embargo, al tratarse de estructuras sólidas, con el tiempo las moléculas tienden a una reestructuración polimórfica hacia un estado energético menor. De este modo se obtiene una forma cristalina que alberga menos espacio en su interior, lo que hace que el compuesto vehiculizado acabe finalmente expulsado de la matriz [102].

(ii) **Complejos lipídicos nanoestructurados (CLN)**: Estos complejos también son sólidos a temperatura ambiente y corporal, sin embargo, su composición incluye además una fracción de lípidos en estado líquido. Esta diferencia evita la ordenación de las moléculas sólidas y la posterior expulsión del compuesto bioactivo, mejorando así su capacidad de carga y reduciendo su contenido en agua [103].

1.2.2.3. Emulsiones

(i) **Microemulsiones (ME) y nanoemulsiones (NE)**: Se trata de dispersiones coloidales obtenidas a partir de la mezcla de aceite, agua y surfactantes. Las dispersiones coloidales consisten habitualmente en una suspensión de pequeñas partículas en un medio líquido, y para ciertas aplicaciones, es recomendable la minimización del tamaño de dichas partículas. De este modo, se puede reducir la agregación de partículas [104], mejorando la estabilidad, y se puede mejorar la biodisponibilidad de ciertos compuestos lipófilos encapsulados en estas emulsiones [105]. MEs y NEs presentan similitudes estructurales, aunque existen diferencias relevantes.

Las MEs se tratan de sistemas isotrópicos que se forman espontáneamente, es decir, sin necesidad de un aporte energético adicional, y con métodos de preparación sencillos. Son formulaciones termodinámicamente estables, y con baja viscosidad y alergenidad, unas características adecuadas para su uso en sistemas portadores [106]. Así, al igual que otros lípidos portadores, mejoran la estabilidad y permeabilidad del compuesto bioactivo, permiten una liberación controlada del mismo, y mejoran su absorción y biodisponibilidad a través del sistema linfático [107].

A pesar de las ventajas expuestas, las MEs presentan limitaciones, ya que son sensibles a cambios en el medio como la temperatura, la fuerza iónica y la composición, lo cual puede

comprometer su estabilidad. Además, las MEs requieren altas cantidades de surfactantes para poder tener una capacidad de carga eficiente, especialmente cuando se usan TAGs como fase oleosa [108].

Las NEs por su parte, pueden ser consideradas emulsiones convencionales, pero con un tamaño de partícula muy pequeño. Se tratan por tanto de dispersiones coloidales inestables de dos líquidos inmiscibles, en el que uno de ellos forma gotas esféricas. Pese a la nomenclatura utilizada, estas formulaciones son de un tamaño mayor que las MEs y su estabilidad termodinámica es menor. Sin embargo, las NEs no se ven afectadas por cambios en el medio, y requieren menor cantidad de surfactantes en su formulación [108].

(ii) **Nanosuspensiones:** La escasa hidrosolubilidad de un compuesto bioactivo no necesariamente implica una buena solubilidad en medios lipófilos. Así, no siempre es posible disolver el compuesto en las cantidades necesarias, incluso tras la adición de excipientes e independientemente del medio utilizado. Para estos casos, el transporte de estos compuestos bioactivos puede ser solventado mediante el uso de nanosuspensiones, donde se omite el proceso de disolución y se mantiene el compuesto en un estado cristalino de tamaño lo suficientemente pequeño [109]. Estas formulaciones se definen como dispersiones coloidales líquidas cuyo tamaño de partícula oscila entre 1-1000 nm [110]. El uso de estas formulaciones ofrece además una ventaja adicional, y es que permite una mayor concentración del compuesto bioactivo, con lo que los volúmenes de administración se reducen, lo que resulta de especial interés cuando las dosis requeridas son altas. Además, el reducido uso de excipientes en relación con el compuesto bioactivo disminuye los posibles efectos adversos sobre el organismo [111]. Sin embargo, estas formulaciones presentan inconvenientes relacionados con su estabilidad, ya que puede existir un crecimiento de cristales y consecuentes procesos de agregación, floculación, y sedimentación [112].

(iii) **Sistemas autoemulsionables (SAEs):** Otra alternativa para abordar la problemática asociada a la escasa solubilidad de algunos compuestos bioactivos es el uso de SAEs, sistemas micro-autoemulsionables (SMAEs) y sistemas nano-autoemulsionables (SNAEs). Se tratan de mezclas isotrópicas, cuya composición cubre un amplio espectro de compuestos, siendo principalmente aceites, surfactantes hidrófilos y lipófilos y co-solventes, categorizados como GRAS. Adicionalmente, se pueden incluir antioxidantes naturales como α -tocoferol o β -caroteno para prevenir procesos oxidativos de la mezcla. La principal característica de estos sistemas es que permanecen en un estado de preformulación hasta su

ingesta. Al entrar en contacto con el medio acuoso del tracto gastrointestinal, junto con los movimientos peristálticos, que facilitan la agitación necesaria, los SAEs se dispersan con rapidez y forman emulsiones de manera espontánea, cuyo tamaño de partícula varía desde menos de 100 nm a más de 300 nm [83].

Pouton [113, 114] introdujo el sistema de clasificación de formulaciones lipídicas (Tabla 1), donde se señalan las principales diferencias en la composición de los distintos tipos de formulaciones y un breve resumen de sus características.

Las formulaciones de tipo I consisten en la solubilización del compuesto bioactivo de interés en TAG o mezcla de otros glicéridos. Por lo general, estos sistemas ofrecen una escasa dispersión inicial en medios acuosos, y requieren de procesos digestivos, en concreto la acción de la lipasa pancreática y co-lipasa, para generar productos de digestión anfífilicos y promover así una transferencia hacia un estado coloidal en la fase acuosa. Sin embargo, dichos procesos digestivos son altamente eficientes y permiten la dispersión de la formulación y la solubilización del compuesto bioactivo. Este grupo de formulaciones por tanto representa una opción relativamente simple para compuestos bioactivos con una alta liposolubilidad [115].

Dentro del tipo II, se enmarcan los SAEs. Esta categoría engloba la formulación con TAGs, DAGs, MAGs y surfactantes insolubles en agua. Habitualmente los aceites presentes en estas mezclas son TAGs con AGs de cadena media, y el carácter autoemulsionable se alcanza al superar el 25% (p/p) de surfactantes en la composición final, siendo la concentración óptima del 30-40%. Una concentración superior al 50% de estos surfactantes puede ralentizar el proceso de emulsión de estos sistemas debido a la generación de fases cristalinas en la interfase aceite-agua [116]. Estas formulaciones producen áreas interfaciales grandes que permiten un reparto eficiente del compuesto vehiculizado entre las gotas de aceite y la fase acuosa, donde ocurre la absorción intestinal [117]. Sin embargo, la escasa disponibilidad de surfactantes lipófilos que sean capaces de promover la autoemulsión, y que el tamaño de partícula que se genera en la emulsión es relativamente grande, ha hecho que el uso de estas formulaciones haya sido sustituido por las formulaciones tipo III [86].

Las formulaciones de tipo III son las comúnmente denominadas SMAEs y SNAEs y se caracterizan por la inclusión de surfactantes hidrofílicos y co-solventes como etanol, propilenglicol y polietilenglicol. Una subdivisión adicional dentro de esta categoría se utiliza para diferenciar aquellas formulaciones con un carácter más hidrofílico (tipo IIIB), en

Tabla 1. Clasificación de las formulaciones lipídicas

	<i>Tipos de formulaciones lipídicas</i>				
	<i>Tipo I</i>	<i>Tipo II</i>	<i>Tipo IIIA</i>	<i>Tipo IIIB</i>	<i>Tipo IV</i>
<i>TAG o mezcla de glicéridos (% p/p)</i>	100	40-80	40-80	<20	—
<i>Surfactantes hidrófobos (% p/p)</i>	—	20-60	—	—	0-20
<i>Surfactantes hidrófilos (% p/p)</i>	—	—	20-40	20-50	30-80
<i>Cosolventes hidrófilos (%p/p)</i>	—	—	0-40	20-50	0-50
<i>Tamaño de partícula de la dispersión (nm)</i>	Grueso	250-2000	100-250	50-100	<50
<i>Características</i>	No dispersante	SAE sin compuestos hidrófilos	SAE/SMAE con compuestos hidrófilos	SMAE con compuestos hidrófilos y contenido reducido en aceite	Formulaciones sin aceite
<i>Importancia de la dilución en agua</i>	Limitada	Capacidad solvente sin afectar	Pérdida parcial de la capacidad solvente	Cambios de fase y pérdida de la capacidad solvente	—
<i>Importancia de la digestibilidad</i>	Requisito crucial	Preferente	Puede estar inhibida	No requerida y no ocurre	No ocurre
<i>Ventajas</i>	GRAS; simple; compatibilidad con cápsulas	Fácil mantenimiento de la capacidad solvente tras la dispersión	Dispersión clara; absorción sin digestión	Dispersión clara; absorción sin digestión	Buena capacidad solvente; dispersión en micelas
<i>Inconvenientes</i>	Pobre capacidad solvente (excepto para compuestos altamente lipófilos)	Dispersión con turbidez	Posible pérdida de la capacidad solvente en la dispersión. Poca digestibilidad	Fácil pérdida de la capacidad solvente tras la dispersión	Pérdida de la capacidad solvente en la dispersión; puede no ser digerible

detrimento de la fase oleosa. A diferencia de las formulaciones de tipo II o SAEs, el tamaño de partícula en la emulsión es más reducido, situándose por debajo de 200 nm en el caso de SMAEs y de 50 nm en el caso de SNAEs, dando lugar a sistemas completa o parcialmente transparentes [118]. El incremento en surfactantes hidrófilos en la composición final de las formulaciones conduce a una mejor dispersión de éstas en el medio acuoso sin necesidad de un proceso digestivo, consiguiendo tamaños de partícula más reducidos, factor directamente relacionado con la absorción intestinal. Sin embargo, la disminución en la proporción de fase oleosa aumenta el riesgo de precipitación del compuesto bioactivo vehiculizado [119].

Las formulaciones tipo IV son básicamente una mezcla de surfactantes y co-solventes y no hay presencia de aceite. El mayor inconveniente de estas formulaciones es la alta probabilidad de precipitación del compuesto bioactivo, y su uso solamente es conveniente si esta precipitación se produce como una suspensión cristalina fina o en partículas amorfas. Además, el uso de estas formulaciones en administración oral puede acarrear problemas con la exposición prolongada de cantidades altas de surfactantes en el tracto gastrointestinal, que puede conllevar irritación y daños locales por la adhesión a las paredes del estómago o del intestino [116].

Si bien el uso de TAGs en formulaciones lipídicas tiene el inconveniente descrito de una baja capacidad de dispersión, y la necesidad de un proceso digestivo, es interesante considerar los productos generados tras esa digestión, esto es, MAGs y AGLs, como punto de partida de una formulación lipídica. Así, el uso de sistemas “pre-digeridos” puede postularse como una alternativa a los SAE descritos anteriormente, con la ventaja de contar con una composición altamente biocompatible y GRAS [116].

Los SAEs, SMAEs y SNAEs se presentan habitualmente en un estado líquido que puede conllevar problemas relacionados con la estabilidad, precipitación de los compuestos vehiculizados, dosis de volúmenes elevados, dificultades con el manejo y transporte y pocas alternativas para su administración. Para evitar esta problemática añadida, una solución está en la generación de SAEs sólidos. Estos sistemas permiten la administración en un amplio espectro de formatos (tabletas, cápsulas, pellets...) y reduce los inconvenientes de las formulaciones líquidas [120]. Estudios actuales se centran en el desarrollo de técnicas aplicables para la solidificación de formulaciones líquidas, que encuentra sus principales

inconvenientes en el posible deterioro del compuesto bioactivo, la reducción de carga, y la posible irreversibilidad del proceso al intentar reconstituir la emulsión [121].

Durante toda esta sección se ha explicado que la finalidad del uso de formulaciones lipídicas está en mejorar y mantener la solubilidad del compuesto bioactivo durante todo el tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal. Sin embargo, recientes estudios demuestran que durante el proceso digestivo, las formulaciones lipídicas pueden perder su capacidad de solvatación, lo que conduce a una sobresaturación del compuesto bioactivo. Si bien este hecho podría derivar en la precipitación del compuesto, estos sistemas sobresaturados tienen una mayor actividad termodinámica, y por tanto un mayor potencial de absorción que los sistemas coloidales que mantienen la solubilidad del compuesto. Así, el uso de estos sistemas sobresaturados se postula como una buena alternativa para compuestos bioactivos con una alta permeabilidad [86, 122]

1.3. Modificación enzimática de lípidos

Como se ha explicado a lo largo de la presente introducción, la modificación estructural de lípidos resulta una estrategia interesante para la obtención de nuevas moléculas con propiedades químicas, físicas, bioactivas y tecnológicas más deseables. Adicionalmente, los criterios de desarrollo sostenible que se están implementando en diversos sectores industriales, han propulsado el interés por procedimientos más comprometidos con el medio ambiente.

En este sentido, el uso de enzimas como biocatalizadores de los mencionados procesos de modificación lipídica puede ser considerado como una alternativa medioambientalmente sostenible a los catalizadores químicos más convencionales, pudiendo de hecho englobarse dentro del concepto de “*Química Verde*” [123]. Los avances dentro de la ingeniería genética han hecho posible obtener enzimas de manera más económica, y con actividad más eficiente, ofreciendo además la posibilidad de crear nuevas cepas con actividades catalíticas diseñadas a la medida de las necesidades, por ejemplo, con mayor estabilidad térmica o frente a cierto pH.

Además de las ventajas medioambientales que ofrece la biocatálisis, el uso de enzimas destaca por su excelente regio-, quimio- y estereoselectividad, que ayuda a desarrollar modificaciones mucho más precisas y controladas, permitiendo el uso de condiciones de reacción más suaves en términos de temperatura y pH, dando lugar a procesos más seguros y benignos [124].

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de estos biocatalizadores presenta determinados inconvenientes a tener en cuenta: (i) su limitada estabilidad ya que son proteínas que se pueden desnaturalizar, y perder total o parcialmente su actividad; (ii) su elevado coste, lo que obliga a optimizar el proceso para minimizar su uso e intentar su recuperación; y (iii) los ciclos de reacción pueden llegar a ser excesivamente largos en comparación con procesos catalizados químicamente [125, 126].

Generalmente, las enzimas ejercen su actividad catalítica en condiciones fisiológicas, es decir, en medios acuosos. Sin embargo, el uso de disolventes orgánicos puede resultar conveniente por las ventajas que presenta, ya que puede cambiar el equilibrio termodinámico de la reacción, minimizar la contaminación microbiana y ser favorable para sustratos insolubles y/o inestables en agua [127]. En la biocatálisis de compuestos lipídicos, los disolventes etanol, acetona y hexano son los más utilizados, sin embargo, con el fin de seguir la línea de las recomendaciones marcadas por la *Química Verde*, y más aun teniendo en cuenta su potencial uso en la industria alimentaria, es preferible descartar el uso de disolventes orgánicos y reemplazarlos por aquellos categorizados como GRAS y de grado alimentario [128]. Además, en ocasiones es incluso posible descartar el uso de disolventes y llevar a cabo la reacción solamente a partir de los sustratos líquidos, lo cual presenta ventajas económicas y de ejecución, sobre todo a escala industrial. Otros medios de reacción alternativos al uso de disolventes son los fluidos supercríticos, principalmente dióxido de carbono, el agua subcrítica, los líquidos iónicos [129] y las mezclas eutécticas [130].

Las enzimas más utilizadas en la modificación de lípidos son las pertenecientes a la subcategoría EC 3.1, hidrolasas que actúan sobre un enlace éster, y más en concreto las lipasas y las fosfolipasas [131]. A continuación, se detallan los principales procesos biocatalíticos donde intervienen estas enzimas.

1.3.1. Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas (triacilglicerolhidrolasas EC 3.1.1.3) son una clase de enzimas con una alta estabilidad y que conservan su actividad catalítica incluso en condiciones desfavorables [132]. Se obtienen a partir de animales, plantas o microorganismos y su función fisiológica es la hidrólisis de TAGs para producir MAGs, DAGs, AGLs o glicerol, en función del grado de hidrólisis (Figura 11).

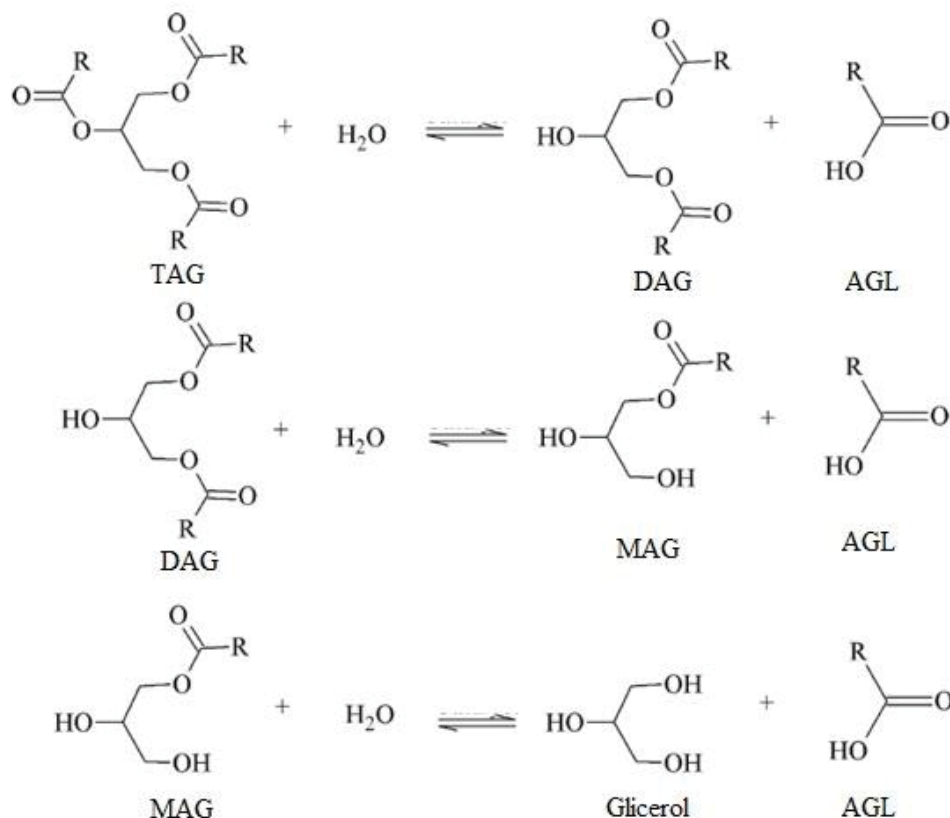


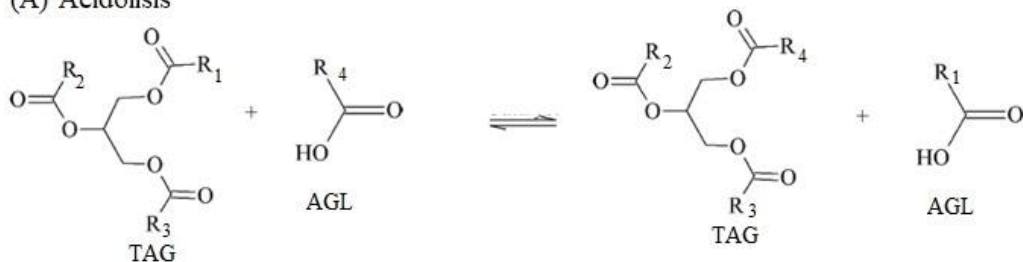
Figura 11. Representación esquemática de la reacción de hidrólisis de triglicéridos.

No obstante, en ausencia de agua y en condiciones controladas, las lipasas pueden catalizar reacciones de esterificación (proceso inverso a la hidrólisis) y transesterificación (Figura 12).

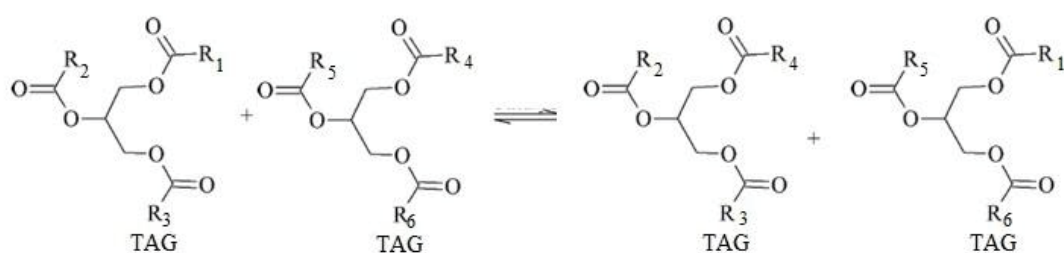
En función del sustrato utilizado, las reacciones de transesterificación se pueden dividir en [133]:

- (i) *Acidolisis*: En este caso, se lleva a cabo el intercambio de un grupo acilo entre un ácido y un éster. Se trata de un mecanismo efectivo para la incorporación del AG de interés como ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico en aceites de origen vegetal para mejorar sus propiedades nutricionales [134] y para la síntesis de lípidos estructurados, como algunos de los descritos en el apartado 1.2.1 de la presente introducción.

(A) Acidolisis



(B) Interesterificación



(C) Alcoholisis

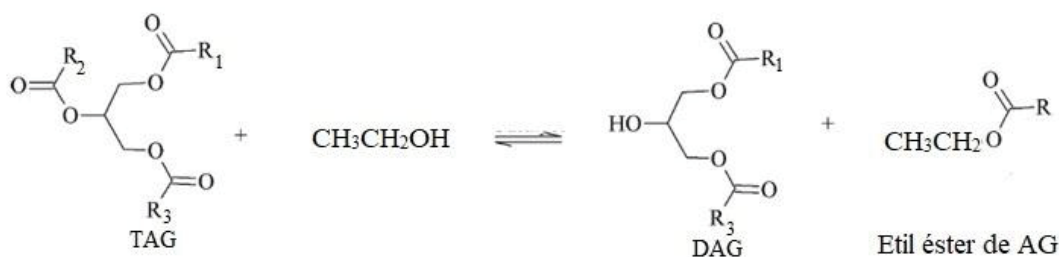


Figura 12. Representación esquemática de los distintos tipos de reacciones de transesterificación. Acidolisis (A), Interesterificación (B), Alcoholisis (C) (concretamente etanolisis).

- (ii) *Interesterificación:* En esta reacción se produce un intercambio de grupos acilo entre dos ésteres, comúnmente TAGs o ésteres de AG. La interesterificación de TAGs se suele emplear como método para cambiar las propiedades físicas de ciertas grasas y aceites mediante la alteración de la distribución posicional de los distintos AGs en los TAGs [135]. La síntesis de TAGs estructurados es posible mediante esta vía, sin embargo, presenta una desventaja, y es que el TAG de interés puede resultar difícil de aislar a partir de la mezcla final de reacción.

- (iii) *Alcoholisis*: Este tipo de transesterificación se produce entre un éster y un alcohol. Se puede diferenciar entre el uso de monoalcoholes de cadena corta, habitualmente entre 1 y 4 carbonos de longitud, y el uso de glicerina como nucleófilo de la reacción. En el primer caso, los productos de reacción son los correspondientes ésteres de AG, y el resto glicérido, en función del grado de conversión alcanzado. Esta reacción es el fundamento de los procesos de obtención de biodiesel [136], pero también es ampliamente utilizada en la industria alimentaria, como en la obtención de concentrados de AGs omega-3 [137]. Por otro lado, el uso de una molécula de glicerol como sustrato, da lugar a las reacciones de glicerolisis, donde se produce una mezcla final de MAGs, DAGs y TAGs [138].

1.3.1.1. Reacciones de glicerolisis enzimática

La reacción de glicerolisis consiste en una transesterificación (tipo alcoholisis), en la que un enlace éster existente entre un grupo acilo y un glicerol se rompe por la acción de una molécula de glicerol libre, que actúa como nucleófilo, siendo transferido el grupo acilo a este último (Figura 13). Las lipasas más utilizadas en estos procesos son *Candida antarctica*, *Thermomyces laguginosa* y *Rhizomucor miehei*.

La reacción de glicerolisis enzimática comprende una fase hidrófoba lipídica, una fase hidrófila de glicerol y la enzima. El mayor inconveniente de este tipo de reacciones es la escasa miscibilidad entre los sustratos [139]. Conforme la reacción avanza, los MAGs y DAGs generados pueden actuar como emulsificantes, mejorando el contacto entre ambos sustratos y mejorando las tasas de conversión, evitando así la adición de disolventes o surfactantes al medio [140].

No obstante, la adición de disolventes apropiados genera un medio de reacción homogéneo, que mejora la transferencia de masa entre los sustratos y los tiempos de conversión. La elección del disolvente se debe hacer atendiendo a la capacidad de disolver ambos sustratos, con lo que debe tener una polaridad intermedia. En este sentido, el uso de alcoholes terciarios, como el *tert*-butanol, ha tenido resultados satisfactorios en lo relativo a rangos de conversión [138]. Hasta la fecha, el reemplazo de disolventes orgánicos por otros categorizados como GRAS en los procesos de glicerolisis enzimática no ha sido descrito en la bibliografía.

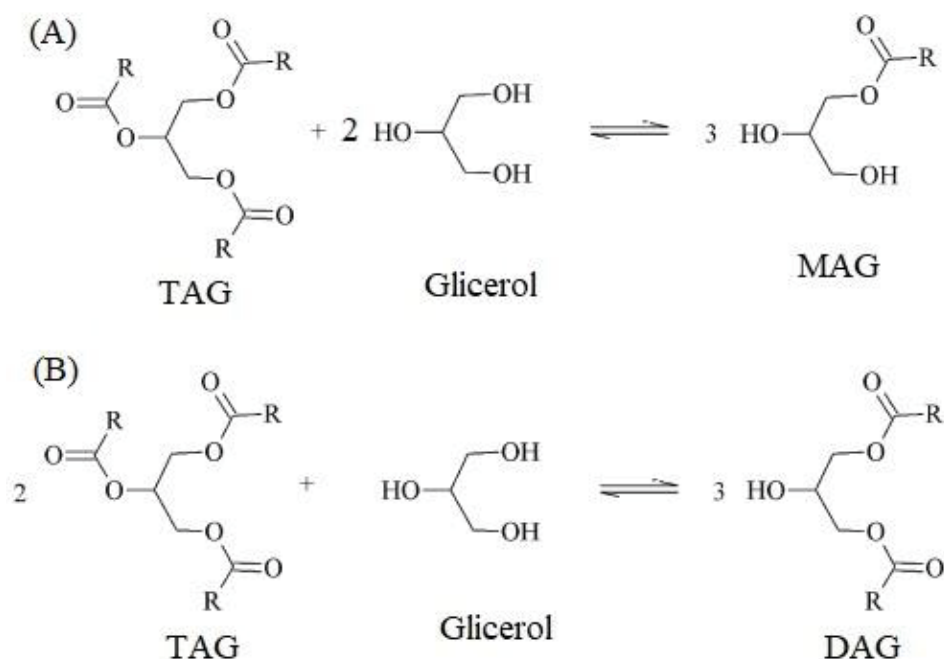


Figura 13. Representación esquemática de la reacción de glicerolisis para dar MAG (A) o DAG (B)

Sin embargo, el uso de disolventes puede causar una reducción en la actividad de la enzima y su vida útil, y añade además una etapa adicional para eliminarlo del producto final. Alternativamente, se plantea el uso de surfactantes, que mejoran el contacto entre los sustratos y la enzima [138].

1.3.1.2. Especificidad de las lipasas

Una de las principales características a tener en cuenta en el uso de lipasas como biocatalizadores de reacciones de modificación de lípidos es su especificidad. Esta característica ha sido aprovechada en la producción de lípidos de interés y la mejora de sus propiedades funcionales y nutricionales. Se distinguen por tanto entre lipasas no específicas y lipasas quimio-, regio- y estereoespecíficas [133].

(i) **Lipasas no específicas:** Ciertas lipasas no muestran ninguna especificidad en las reacciones de transesterificación, lo que hace que se produzcan mezclas finales de reacción con un reparto aleatorio de los AG en las distintas posiciones de los TAGs. Entre estas enzimas están *Corynebacterium acnes* y *Staphylococcus aureus*.

(ii) **Regioespecificidad:** Habitualmente, las enzimas incluidas en esta categoría tienen preferencia por catalizar AG en las posiciones *sn-1* y *sn-3*. Esto es debido a que existe un impedimento estérico que no permite que los AGs en posición *sn-2* entren en el centro activo de la enzima, aunque esto no implica que la reacción estos AGs esté totalmente anulada. Además, la posible acilmigración espontánea de los AGs en posiciones *sn-2* hacia *sn-1* y *sn-3*, complica el estudio de esta especificidad posicional. Enzimas como *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, o *Rhizopus oryzae* muestran estas características.

(iii) **Quimioespecificidad:** Las lipasas pueden presentar una preferencia en función de la naturaleza química del sustrato. Por ejemplo, Fernández y col. [141] observaron una clara discriminación de todas las enzimas estudiadas en la reacción de etanolisis de TAGs y DAGs, siendo la conversión de estos últimos inferior. La quimioespecificidad de las lipasas también puede estar relacionada con los AGs que constituyan el lípido. En este sentido, se diferencian entre lipasas específicas por AGs de cadena larga o AG de cadena media o corta, como *Rizhomucor miehei* (que muestra preferencia por AGs de cadena corta), o según el número de dobles enlaces y la posición de los mismos, como *Candida rugosa*.

(iv) **Estereoespecificidad:** Las escasas lipasas que describen esta característica, como las obtenidas a partir de *Pseudomonas* o la lipasa pancreática porcina, son capaces de catalizar las posiciones *sn-1* y *sn-3* a distintas tasas y velocidad de reacción.

1.3.2. Reacciones catalizadas por fosfolipasas

A nivel biológico, las fosfolipasas ejercen un papel esencial en la regulación celular, metabolismo y biosíntesis de FLs. La presencia de estas enzimas está extendida a la mayoría de organismos vivos, incluyendo plantas, animales, hongos y bacterias, y hasta la fecha, un gran número de fosfolipasas han sido purificadas, caracterizadas y clonadas.

Si bien estas enzimas van a actuar sobre FLs, su acción biocatalítica va a depender del enlace sobre el que actúen, distinguiéndose entre acilhidrolasas, que incluyen a las fosfolipasas A1 (FLA1), FLA2, y las fosfodiestearasas, donde se enmarcan la fosfolipasa C (FLC) y FLD (Figura 14) [142].

La FLA1 cataliza la hidrólisis del enlace éster de la posición *sn-1* del FL, generando el correspondiente liso-FL y AGL, y se encuentra presente prácticamente en todas las células. Sin embargo, pese a su extendida presencia, su purificación es un proceso complicado, y unido a

que las lipasas estereoespecíficas *sn*-1 y *sn*-3 descritas en el apartado anterior pueden desempeñar la misma actividad catalítica, las FLA1 no se han usado excesivamente. No obstante, un avance en la purificación de estas enzimas podría ser de particular interés para aumentar los escasos rendimientos alcanzados en el uso de lipasas sobre FL [143].

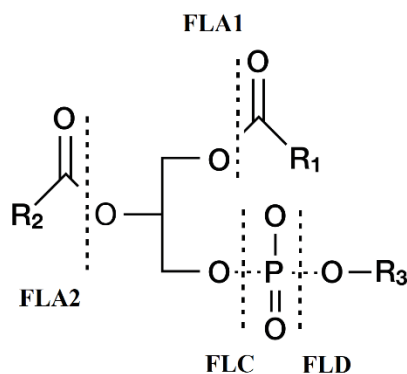


Figura 14. Especificidad posicional de las fosfolipasas.

La actividad catalítica de la FLA2 es la misma que la FLA1, pero actúa específicamente sobre la posición *sn*-2 del FL. Se trata de una de las fosfolipasas más estudiadas, y su uso está más extendido que en el caso de la FLA1. Existen numerosas casas comerciales que suministran esta enzima, y su uso en la industria alimentaria incluye procesos como la modificación de emulgentes como lecitinas de huevo, el desgomado de aceites o la síntesis de FLs bioactivos [143].

La FLC actúa en el enlace fosfodiéster más cercano a la cadena de glicerol de un FL, dando lugar a DAG y un éster de fosfato orgánico. Su función biológica está presente en procesos de transducción de señales, aunque la disponibilidad de esta enzima es limitada. No obstante, su uso está implementado en procesos industriales como el desgomado enzimático de aceites y grasas [144].

Por último, la FLD cataliza la ruptura del enlace entre la cabeza polar del FL y el grupo fosfato, generando ácido fosfatídico (AF) y el correspondiente residuo hidrofílico. Esta enzima está presente en organismos procariotas y eucariotas, y está disponible comercialmente. La actividad de la FLD es la base de las reacciones de transfosfatidilación, en las que la cabeza polar mencionada se intercambia por una molécula con un grupo hidroxilo disponible [145]. Esta capacidad para formar nuevos enlaces éster en presencia de un medio acuoso es una

característica única de esta enzima, lo que le aporta un interés adicional en la síntesis de nuevos compuestos [65].

1.3.2.1. Reacciones de transfosfatidilación

La reacción de transfosfatidilación se puede producir en medios bifásicos, emulsiones y microemulsiones. La presencia de una fase acuosa favorece la actividad enzimática de la FLD, que se activa en la interfase generada. Así, la reacción puede ocurrir tanto en la fase acuosa para alcoholes solubles en agua, como en la fase orgánica, si el sustrato tiene un carácter lipófilo. Si bien la FLD cataliza la reacción de transfosfatidilación, la presencia de agua en el medio de reacción también favorece la hidrólisis del FL hacia la generación de AF (Figura 15) [146].

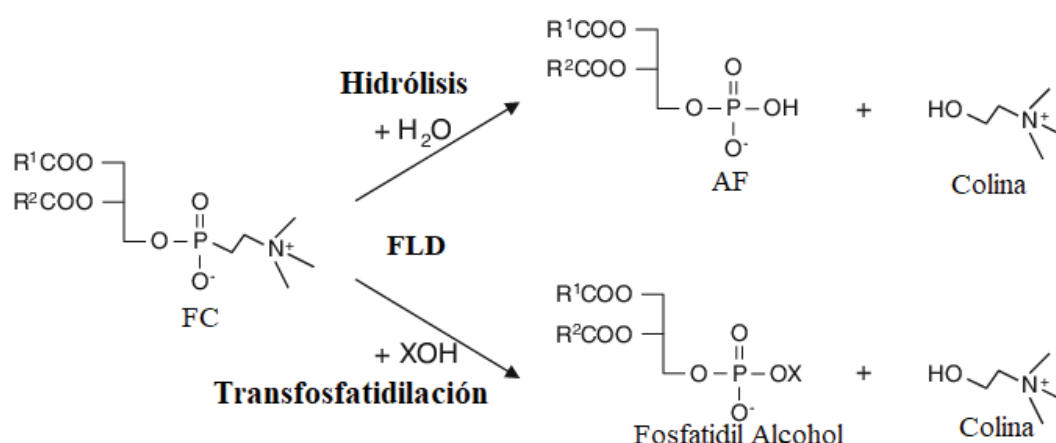


Figura 15. Representación esquemática de las reacciones de hidrólisis y transfosfatidilación catalizadas por la FLD.

En este sentido, la naturaleza del disolvente puede tener una importante relevancia en el desarrollo de la reacción y la preferencia de la FLD por catalizar una de las dos posibles vías. Habitualmente, el medio bifásico necesario para el desarrollo de la reacción se consigue con un tampón acuoso, ajustado a un pH óptimo para el correcto funcionamiento de la FLD, mientras que éter dietílico, cloroformo o acetato de etilo han sido comúnmente elegidos como la fase orgánica [147]. Sin embargo, se han utilizado alternativas medioambientalmente más sostenibles para reemplazar el uso de disolventes orgánicos convencionales [69, 148].

El contenido en agua es también de especial importancia, ya que está directamente relacionado con la reacción de hidrólisis. Esta reacción se desarrolla de manera paralela y no deseada, ya que consume parte del sustrato y da lugar a la acumulación de AF en el producto final, siendo éste más difícil de purificar. Con el fin de eliminar o reducir la presencia de agua en el medio de reacción, el uso de líquidos iónicos ha sido descrito con resultados prometedores, inhibiendo la reacción de hidrólisis casi en su totalidad [149].

Adicionalmente al estudio sobre el medio de reacción utilizado, otra característica a tener en cuenta en las reacciones de transfosfatidilación es su baja productividad. Atendiendo a las pautas marcadas por Pollard y Woodley [150], para que un proceso biotecnológico sea económicamente viable, la productividad volumétrica deber ser al menos de 50 a 100 g/L, y el coste relativo de la enzima, es decir, los g de producto obtenido entre los g de biocatalizador utilizado, debe situarse en una proporción de 100:1. Tecnologías como la inmovilización de enzimas han tenido resultados óptimos en las reacciones de transfosfatidilación [151]. Alternativamente, la eliminación de producto de reacción *in situ* puede resultar una estrategia plausible, ya que puede favorecer el desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la síntesis de productos [152].

1.3.3. Inactivación enzimática

Como se ha comentado anteriormente, uno de los problemas asociados a la catálisis enzimática reside en la inestabilidad del catalizador. Debido a su carácter proteico, las enzimas pueden ser susceptibles de procesos de desnaturalización, lo que acarrea una reducción en la actividad catalizadora. Los principales factores que pueden alterar esta la conformación de la enzima son [133]:

- (i) *Temperatura*: Por lo general, un incremento en la temperatura conlleva una mayor tasa de reacción. Sin embargo, el uso de temperaturas excesivamente altas puede llevar a la desnaturalización irreversible de la proteína. Por lo general, las lipasas extraídas de animales y plantas son menos termoestables que aquellas de origen bacteriano.
- (ii) *pH*: Las lipasas tienen un rango de pH en el que su actividad es máxima, que normalmente se sitúa entre 7 y 9, aunque puede abarcar desde 4 a 10. El pH determina el estado de ionización de los residuos aminoácidos de la proteína, y un

cambio en el mismo puede variar la carga eléctrica, produciendo una modificación de la estructura de la enzima, que puede perder su actividad.

- (iii) *Contenido y actividad de agua*: Se ha descrito anteriormente que la presencia de agua en el medio de reacción puede llevar al desarrollo de reacciones secundarias no deseadas, como la hidrólisis. Además, también puede haber procesos de agregación enzimática que dificulten su interacción con los sustratos. Sin embargo, un medio completamente anhidro puede causar la desnaturalización de la proteína.
- (iv) *Concentración de sales*: La presencia de iones en el medio puede influir sobre las interacciones propias de los aminoácidos que estabilizan la estructura tridimensional de la enzima. Por tanto, la concentración en exceso o la total ausencia de iones puede afectar a la actividad de la enzima.
- (v) Otros factores como la composición de los sustratos, la presencia de agentes surfactantes, o la acumulación de producto de reacción también pueden influir sobre la actividad de la enzima.

1.3.4. Cinéticas enzimáticas

En la optimización de una reacción catalizada enzimáticamente, es conveniente conocer diferentes parámetros que pueden afectar al desarrollo de dicha reacción. De este modo, según se ha expuesto con anterioridad, un concepto como la especificidad enzimática puede tener una gran influencia en la obtención de productos de interés de manera satisfactoria. Asimismo, es conveniente determinar la velocidad a la cual se desarrolla la reacción o en qué medida puede estar produciéndose una inactivación enzimática que disminuya la actividad del biocatalizador. Mediante un estudio cinético, haciendo uso de modelos matemáticos, se pueden obtener valores numéricos de estos parámetros, lo que aporta un conocimiento más pormenorizado del desarrollo de la reacción, permitiendo así una correcta optimización de la misma.

Hay gran número de autores que han descrito estudios cinéticos de reacciones enzimáticas. Torres y col. [153] utilizaron un modelo uni-respuesta derivado del mecanismo de Michaelis-Menten para describir la formación de etil ésteres en la reacción de etanolisis enzimática de un subproducto del aceite de oliva. Pessoa y col. [154] por su parte estudiaron la etanolisis de aceites de girasol y soja para la producción de biodiesel, desarrollando un modelo

cinético basándose en mecanismos *Ping-Pong Bi-Bi* y teniendo en cuenta el efecto inhibitorio del etanol sobre el biocatalizador.

Por otro lado, el modelado cinético de reacciones de acidólisis enzimática también ha sido objeto de estudio. Pachecho y col. [155] llevaron a cabo una reacción de acidólisis entre aceite de girasol y una mezcla de ácido palmítico y ácido esteárico, catalizada por *Rhizomucor miehei*, ajustando la desaparición de los AG a un modelo *Ping-Pong Bi-Bi* de manera satisfactoria, mientras que Palla y col. [156] observaron que en sus experimentos este mecanismo sólo era válido hasta las 24 h de reacción, por lo que propusieron un modelo cinético adicional. Ray y col. [157] llevaron a cabo la misma reacción catalizada por la enzima *Rhizopus oryzae*, observando que la evaluación de manera conjunta de todas las etapas del proceso, incluida la reacción paralela de hidrólisis, mostraba el mejor ajuste matemático.

En relación con los AKGs, Torres y col. [50] estudiaron el proceso de obtención de un DAKG mediante la reacción de interesterificación enzimática entre etilbutirato y batil alcohol, catalizada por la lipasa de *Candida antarctica*, describiendo un modelo enzimático que verificaba la diferente tasa de reacción entre la etapa de esterificación primaria (correspondiente a la posición *sn-1*) y la secundaria (posición *sn-2*), estimando también la vida útil del biocatalizador. El producto de esta reacción fue utilizado más tarde por el mismo grupo de investigación [158], como sustrato de la reacción de etanolisis enzimática catalizada por la lipasa de *Candida antarctica*, realizando una comparación con su análogo TAG, la tributirina. El análisis cinético de este estudio permitió verificar la quimioespecificidad de esta enzima, basándose en la menor tasa de conversión obtenida para los AKGs en comparación con la tributirina.

Uno de los primeros trabajos en describir aspectos cinéticos de la reacción de glicerolisis enzimática fue publicado en 2005 por Moquin y col. [159], quienes correlacionaron la reacción de glicerolisis enzimática de aceite de soja en CO₂ supercrítico con una serie de reacciones reversibles, teniendo en cuenta la reacción de hidrólisis que se produce de manera paralela. Posteriormente, se han desarrollado estudios cinéticos de la glicerolisis enzimática de aceite de oliva [160-162], de palma [163] y de aceites de pescado [164] entre otros.

1.4. Comportamiento cristalino y caracterización de sistemas lipídicos

Muchas de las propiedades atribuidas a algunos aceites y grasas, tienen su justificación en las características físicas de las redes estructurales formadas. Por ejemplo, para grasas como el chocolate, la palatabilidad en boca va a depender de la estructura cristalina de los TAGs que lo componen, al igual que la plasticidad de la mantequilla o la funcionalidad de la leche [165]. Lo mismo ocurre en el caso de aceites líquidos, como aceites de fritura, mayonesas o aderezos, donde la cristalización de alguno de sus compuestos puede suponer efectos no deseados en el producto [166]. Asimismo, en sistemas de vehiculización lipídica, las macroestructuras formadas por los lípidos anfifílicos van a ser decisivas en lo relativo a la capacidad de carga de compuestos bioactivos y en la liberación de éstos en el tracto gastrointestinal tras su ingesta [167].

1.4.1. Comportamiento cristalino en medios hidrófobos.

Para la mayoría de las mezclas lipídicas con carácter sólido o semi-sólido, las propiedades físicas del sistema son determinadas a través del estudio de la componente sólida, que habitualmente se presenta como una red tridimensional cristalina [168]. El crecimiento de la red cristalina comienza cuando alguna de las moléculas se reordena y cristaliza en forma de lamelas desde el estado fundido a unos cristales primarios. Una vez formados estos cristales, se forman agregados mediante transferencia de masa y calor para formar policristales o agregados cristalinos, hasta que se forma una red tridimensional [169].

El proceso de cristalización puede dar lugar a la formación de distintas estructuras a partir de una misma grasa. Este fenómeno se conoce como polimorfismo. Por ejemplo, en el caso de grasas compuestas por TAGs, factores como la velocidad de cristalización, el tamaño de los cristales, la temperatura o la presión, pueden dar lugar a la generación de distintos polimorfismos, denominados α , β' y β , cuya disposición estructural se corresponden con estructuras hexagonales, ortorrómbicas y triclinicas respectivamente [170]. La estabilidad de cada estructura formada varía, y con el fin de alcanzar el estado de mínima energía, puede existir una reordenación molecular que conduzca de un estado polimórfico a otro. Estas transformaciones polimórficas transcurren según muestra la Figura 16 esto es, de $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$, siendo el estado polimórfico β el más estable. Adicionalmente a la estructura cristalina generada, también se puede diferenciar entre el grado de empaquetamiento generado según la disposición de las cadenas acilo de los TAGs. Así, TAGs formados por AGs con propiedades

similares se empaquetan de manera más compacta, dando lugar a lo que se denominan estructuras de doble longitud de cadena (2L), mientras que si existen diferencias relevantes en las propiedades de los AGs, el empaquetamiento es menor, dando lugar a estructuras con longitud de cadena triple (3L) (Figura 16).

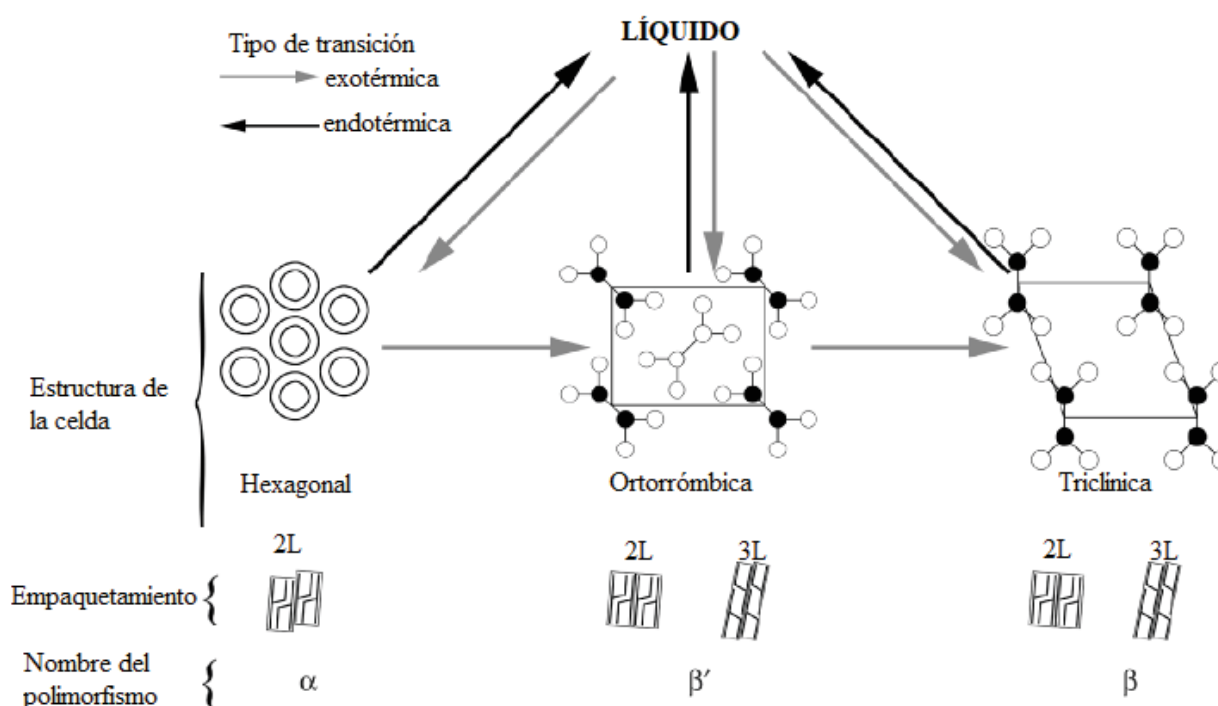


Figura 16. Formas polimórficas de cristales de grasa, incluyendo las posibles transiciones polimórficas, las estructuras de empaquetamiento de las celdas, las características de estabilidad y las conformaciones de los TAGs [171].

En los vehículos lipídicos, el proceso de transformación polimórfica de una fase a otra puede ser una causa de expulsión de la matriz del compuesto bioactivo transportado. El reordenamiento a estructuras termodinámicamente más estables implica un grado de empaquetamiento mayor, lo que conlleva un menor espacio entre las cadenas de AGs y los residuos de glicerol, haciendo que ya no sea posible albergar el compuesto bioactivo [172]. Por ello es importante controlar dichas transformaciones polimórficas. Una posible estrategia es intentar preservar la fase α durante el mayor tiempo posible, por ejemplo conservando el compuesto en refrigeración [173]. Alternativamente, se puede promover una rápida

transformación polimórfica hacia la fase β , de manera que el material ya sea estable durante su almacenamiento [174].

Los MAGs pueden comportarse de manera análoga a los TAGs, ya que también tienen un comportamiento cristalino y forman distintos polimorfismos en función de las condiciones de cristalización utilizadas, que influirán sobre sus propiedades tecnológicas y funcionales [175]. Son tres las formas polimórficas generalmente descritas para los 1-MAGs, sub- α , α y β , con un grado de empaquetamiento de doble longitud de cadena. Al igual que ocurre con los TAGs, también pueden existir transformaciones polimórficas hacia la conformación β , más estable. Sin embargo, el comportamiento polimórfico para MAGs de AG insaturados, como la monooleína (MO), la monolinoleína o la monolinolenina, ha demostrado ser más sencillo, ya que cristaliza directamente en la forma estable β [176]. Los 2-MAGs, independientemente de la presencia o no de dobles enlaces, no tienen polimorfismo y cristalizan directamente en la forma β , con un punto de fusión ligeramente menor que su análogo asimétrico [177]. Las mezclas de distintos MAGs pueden dar lugar a un mayor número de polimorfismos que cuando se encuentran aislados. Recientemente, Alfutimie y col. [178] observaron fases α -gel, sub- α , cristal β_1 , cristal β_2 e isotrópica L_2 a partir de una mezcla de MO y monoestearina.

Lo descrito hasta este punto sucede en mezclas relativamente sencillas de glicéridos, es decir, sistemas cuya composición abarca tan solo moléculas de TAG o MAG. Sin embargo, es habitual encontrarse con mezclas de distintos glicéridos con distintos perfiles de AGs. De hecho, existe un reciente interés en el estudio de la interacción entre distintos lípidos y las consecuencias de estas asociaciones interlipídicas en sus propiedades [179]. Frederick y col. [180] observaron que los MAGs obtenidos a partir de aceite de girasol, con alguna insaturación en sus AGs, no tenían efecto en el proceso de nucleación de los cristales del aceite de palma, mientras que MAGs saturados favorecían dicho proceso. Estos autores atribuyeron este efecto a la similitud que existe entre el aceite de palma y los MAGs saturados. Los MAGs forman micelas inversas, y en el caso de que sean saturados, debido a su alto punto de fusión, pueden cristalizar, lo que hace que actúen como núcleo de cristalización.

Por otro lado, resulta de interés la inclusión de MAGs en una matriz oleosa líquida. Este tipo de mezclas ha sido objeto de estudio por la variedad de polimorfismos que genera (Figura 17). A altas temperaturas, la mezcla se encuentra en un estado fluido isotrópico, con la posibilidad de que exista la formación de micelas. Por debajo de la temperatura de gelificación, se desarrolla la fase lamelar inversa, o α -gel (L_β), similar a la fase α -gel descrita para MAGs

puros, con una estructura hexagonal. Si la temperatura sigue disminuyendo hasta alcanzar la temperatura de cristalización del surfactante, se reorganiza para formar los cristales sub- α , con una estructura de red ortorrómbica [181, 182].

Las dos fases α formadas son metaestables. Sin embargo, con el paso del tiempo, la estructura microscópica cambia, sufriendo una transformación con consecuencias en sus propiedades físicas. Esta nueva estructura, denominada β -cristal ($L_{\beta'}$), tiene una celda unidad triclinica. Finalmente, esta reordenación puede llevar a un máximo empaquetamiento, estableciéndose enlaces de hidrógeno entre las cabezas polares, y expulsando la fase líquida, observando así una sedimentación [182].

El uso de las mezclas entre MAGs y aceites es una alternativa interesante al uso de grasas convencionales, ya que se obtienen sistemas lipídicos con propiedades físicas de interés, pero con una reducción en el contenido en AGs saturados y sin la presencia de AG trans, disminuyendo los niveles de TAG, AGL e insulina en sangre [183, 184].

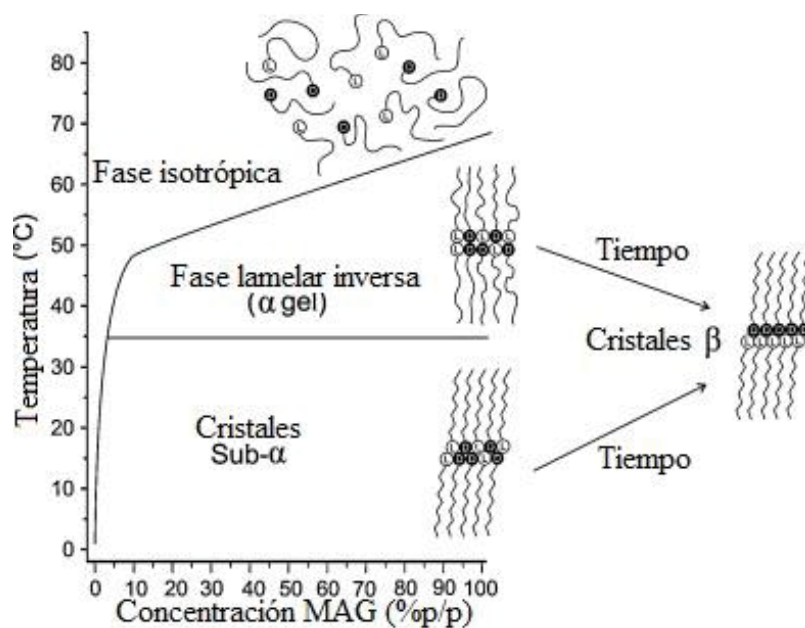


Figura 17. Posibles conformaciones en la mezcla MAG-aceite, en función del contenido en MAG y la temperatura. Con el paso del tiempo, las conformaciones α -gel y sub- α , se reordenan para la formación de cristales β [185].

1.4.2. Comportamiento cristalino en medios hidrófilos.

Una de las principales aplicaciones de los MAGs, ha sido su uso en emulsiones de medio acuoso. Una propiedad característica de los MAGs en agua es su capacidad para formar mesofases liotrópicas o cristales líquidos mediante un proceso de auto-ensamblaje. Los MAGs cristalizan formando bicapas que son insolubles en agua. Sin embargo, al ser sometidos a calor, el MAG se funde a la vez que permite la entrada en la región hidrófila de las bicapas, lo que da lugar a la formación de fases líquidas cristalinas [186]. El comportamiento de los MAGs en la fase acuosa presenta una mayor complejidad de polimorfismos en función de la temperatura y la relación entre MAG y agua (Figura 18), así como de las cadenas alifáticas propias de cada MAG, la presencia de otros compuestos y las condiciones del medio en lo relativo a salinidad, pH y presión [187].

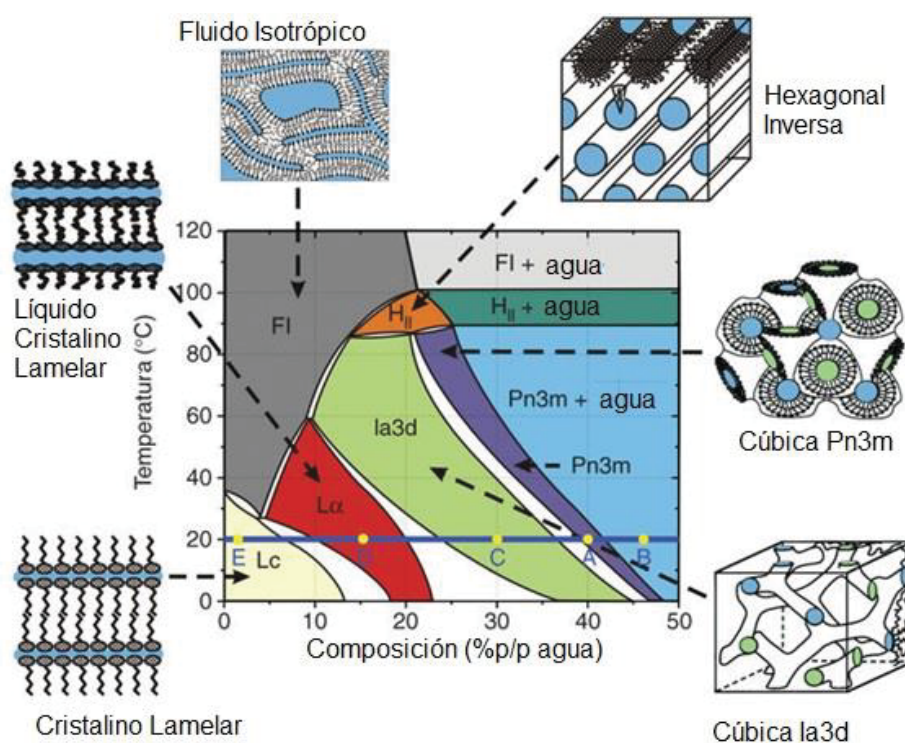


Figura 18. Diagrama de fases para las mezclas de MO y agua en función de la temperatura [188].

Estas fases líquidas cristalinas se encuentran presentes de manera bastante generalizada en distintos medios. Por ejemplo, las membranas celulares son resultado de la formación de estas estructuras. También durante el proceso digestivo de grasas, en el que las micelas

formadas a raíz de la acción de las lipasas sobre los TAGs responden a estos polimorfismos [189]. En los últimos años, las fases cúbicas ($V_2 - Pn3m$ y $Ia3d -$) y hexagonales, han recibido mucho interés debido a su potencial uso como sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos, principalmente por su estabilidad y por su capacidad para liberar el compuesto bioactivo de una manera controlada [190]. En la fase cúbica, los compuestos bioactivos hidrofílicos se albergan en el canal de agua formado entre las cabezas polares, mientras que los lipófilos se sitúan en la bicapa lipídica. Por su parte, las fases hexagonales forman un dominio acuoso donde se posicionan los compuestos bioactivos polares, mientras que los compuestos apolares se sitúan entre las regiones hidrofóbicas generadas (Figura 19) [191].

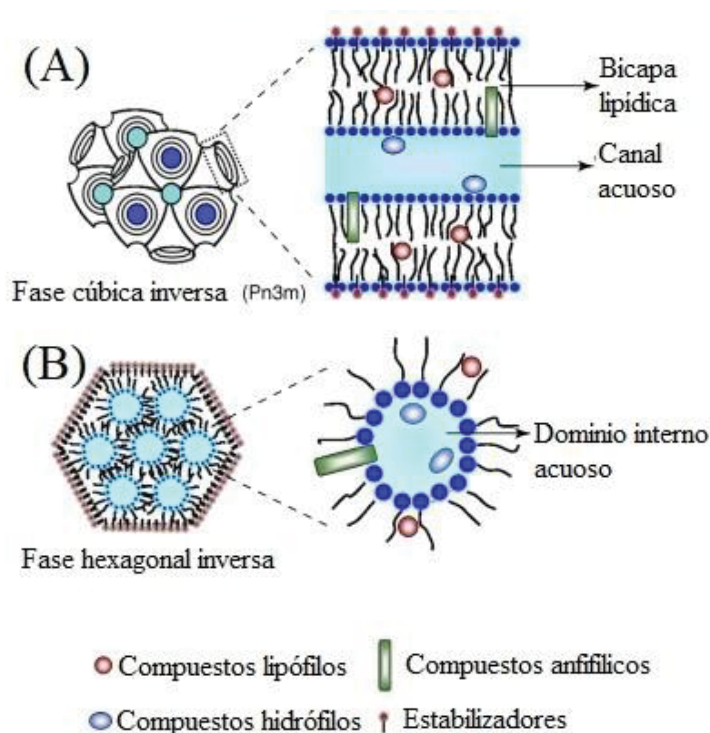


Figura 19. Posible localización de compuestos bioactivos en las mesofases cúbica (A) y hexagonal inversa (B) formadas en la mezcla de MAG y agua [191].

De manera generalizada, uno de los compuestos más utilizados para la formación de fases líquidas cristalinas ha sido la MO. Como muestra la Figura 18, en exceso de agua, siendo éste el caso del tracto gastrointestinal, y a temperatura corporal, la MO será capaz de generar fases cúbicas bicontínuas ($Ia3d$), mientras que la adición de aceites u otros compuesto lipófilos puede favorecer la formación de fases hexagonales [192]. Alternativamente, para conseguir la

formación de estructuras hexagonales en medios acuosos a temperatura corporal, se puede hacer uso de los análogos éter, como 1-gliceril monooleil éter, o selachil alcohol, que da lugar a una fase hexagonal inversa [193].

Las diferencias estructurales entre estas mesofases van a estar directamente relacionadas con sus coeficientes de difusión, principalmente de los compuestos bioactivos albergados en las fracciones acuosas. En el caso de las mesofases cúbicas micelares, el compuesto bioactivo tiene que atravesar continuamente las regiones hidrófobas, mientras que esto no es necesario en las fases cúbicas continuas, con lo que la tasa de difusión es más rápida. La topología dimensional también va a influir en estos coeficientes. Por ejemplo, las fases hexagonales inversas solo existen en una dirección, lo que ralentiza el movimiento de los compuestos bioactivos. Aunque la comparación directa de las tasas de difusión entre las distintas mesofases se debe hacer teniendo en cuenta la fracción de agua de cada una, existe una tendencia generalizada a ordenar los coeficientes de difusión de la siguiente manera: *cúbica bicontinua* \geq *hexagonal inversa* \geq *cúbica micelar* [167].

1.4.3. Técnicas de caracterización física.

En el estudio de sistemas lipídicos y su comportamiento cristalino y polimórfico, se hace uso de distintas técnicas de caracterización física. En el siguiente apartado se describen brevemente algunas de ellas, especialmente las que están más relacionadas con el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

1.4.3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Mediante un incremento o descenso controlado de la temperatura aplicada a la muestra estudiada, se pueden obtener distintos termogramas, que indican el calor absorbido o desprendido en comparación con una muestra control, mediante un cambio en la señal. Los parámetros habitualmente analizados son las temperaturas a las cuales se producen estos cambios, que son las temperaturas de cristalización (T_c), de fusión (T_f), con sus correspondientes temperaturas de inicio (T_{oc} y T_{of}) y las entalpías (ΔH), definidas por el área de la curva descrita (Figura 20). Las T_c y T_f varían en función de la rampa de temperatura utilizada, y sin embargo, los T_o se mantienen relativamente constantes [194].

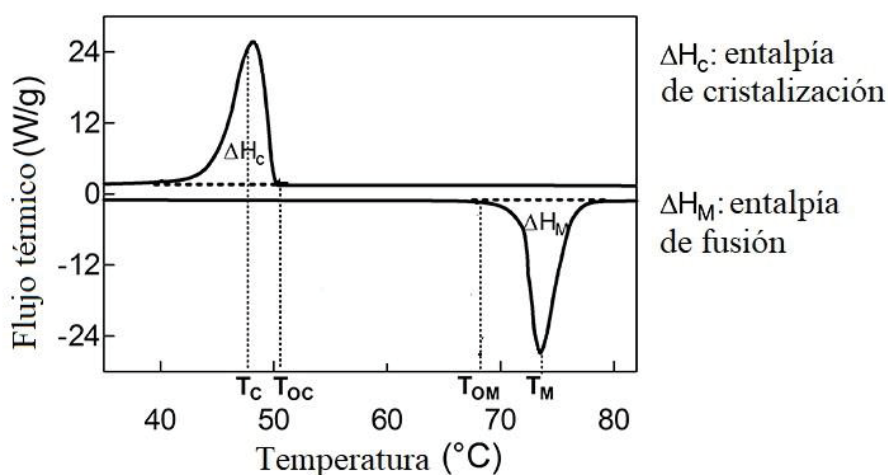


Figura 20. Diagrama esquemático de un termograma, en el que se representa el calor en función de la temperatura. Se muestran los parámetros habitualmente medidos en el estudio de sistemas lipídicos [194].

Esta técnica también permite elucidar el comportamiento polimórfico de los sistemas lipídicos. En la Figura 21, correspondiente a la curva de fusión distintos MAGs y su mezcla 50:50, se pueden observar distintos picos de absorción y de emisión de calor. Este hecho correspondería a las transformaciones polimórficas, ya que el reordenamiento molecular puede conllevar una emisión de calor [178].

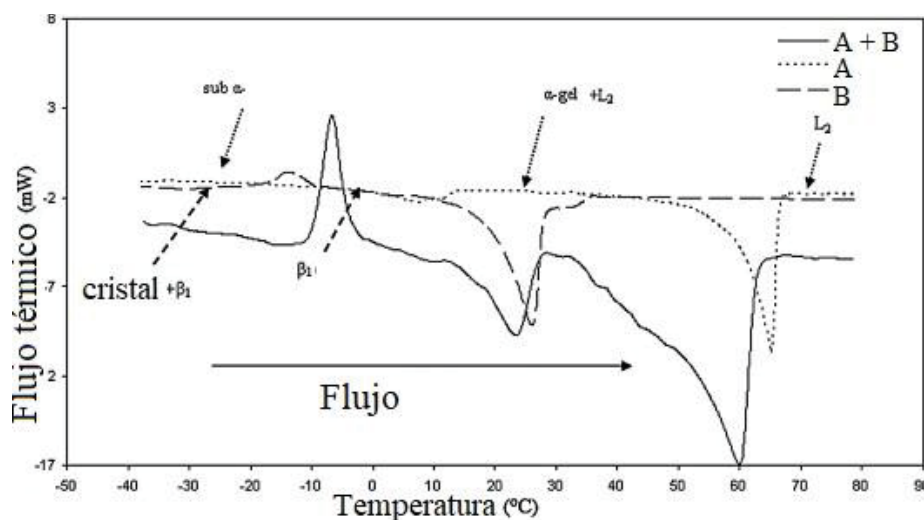


Figura 21. Ejemplo de la identificación de las transformaciones polimórficas en la curva de fusión correspondiente a un análisis de calorimetría diferencial de barrido de 2 MAGs (A y B) y su mezcla (A + B) [178].

1.4.3.2. Difracción de Rayos X (XRD)

Entre las distintas interacciones entre un haz de Rx y la materia, la difracción producida por un objeto cristalino permite dar información sobre las dimensiones de la celda unitaria, esto es, su polimorfismo, y los espacios lamelares entre los distintos planos [194].

En la Figura 22 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de la técnica de XRD. Sobre la muestra incide un haz de Rx con un ángulo determinado (θ), que es difractado hacia el detector. La detección de este haz difractado será función de la materia cristalina que se encuentre, y dará lugar a una intensidad determinada. Así, se obtiene una gráfica de intensidad en función del 2θ o histograma.

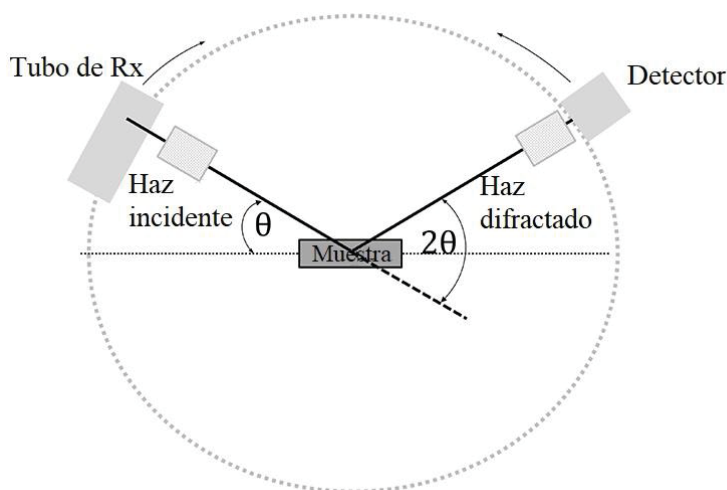


Figura 22. Representación esquemática del funcionamiento de un análisis de difracción de Rx [194].

En el histograma se deben diferenciar dos regiones, las de ángulos pequeños o SAXS ($1^\circ < 2\theta < 12^\circ$) y las de ángulos grandes o WAXS ($12^\circ < 2\theta < 35^\circ$). La posición, intensidad y forma de los picos obtenidos provee información sobre la estructura cristalina de la muestra analizada. La posición de cada pico dentro de la región SAXS puede dilucidar cuál es la distancia lamelar de la muestra, mientras que en la región WAXS se obtiene información sobre la celda unitaria. La intensidad de los picos, utilizada como intensidad relativa, permite saber la presencia de uno o más polimorfismos (Figura 23).

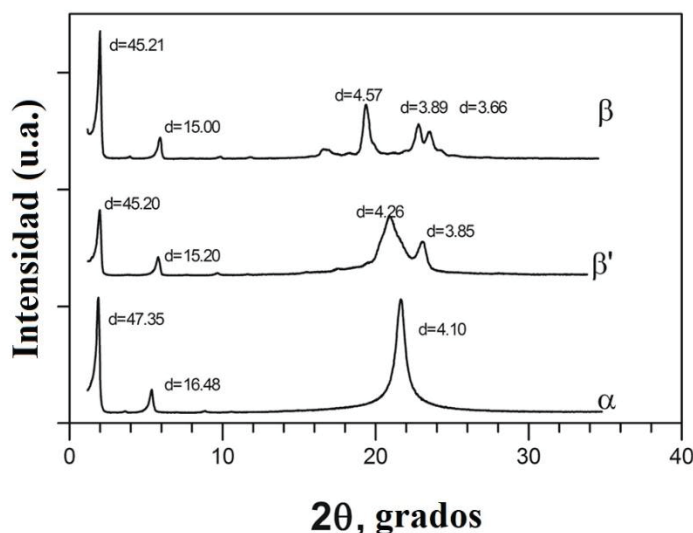


Figura 23. Diagrama esquemático de un análisis de XRD en el que se identifican los distintos polimorfismos de una grasa en función de los ángulos de difracción obtenidos. u.a.: unidades aleatorias [194].

1.4.3.3. Técnicas de imagen microscópica

La caracterización microscópica de sistemas lipídicos se puede realizar a través de diversas técnicas de imagen microscópica. Una de las más estudiadas es la microscopía de luz polarizada (PLM), que proporciona información de manera cualitativa y cuantitativa. El uso de PLM permite distinguir entre las fases sólidas y líquidas de la muestra, ya que los cristales al reflejar la luz, aparecen como áreas de color más claro, mientras que la fase líquida permanece oscura. Esta tecnología tiene un límite de resolución de aproximadamente 1-2 μm [169].

Alternativamente, la microscopía criogénica electrónica de barrido permite el estudio de la superficie. Sin embargo, su resolución es relativamente más baja ($\sim 5 \mu\text{m}$), ya que el contraste entre los cristales y el aceite congelado es pobre. Para el estudio de muestras más gruesas, de manera complementaria se puede hacer uso de microscopía de barrido confocal y de microscopía de fotón múltiple, aunque su resolución también es menor y requiere la incorporación de un tinte fluorescente en la muestra. Por último, la microscopía de transmisión electrónica permite una resolución mucho más alta en el estudio de cristales obtenidos a través de cristalización de grasas en emulsiones o en disolventes orgánicos [169].

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se centró en el uso de alquilglicerol para el desarrollo de vehículos lipídicos con potencial bioactividad. No obstante, estos compuestos presentan como principal desventaja su baja bioaccesibilidad y biodisponibilidad cuando se administran de manera aislada. Así pues, se plantearon dos estrategias que permitieran avanzar ante esta problemática:

- (i) La administración de estos compuestos en una matriz oleosa con alto grado de digestibilidad, que permita mejorar la dispersión y posterior biodisponibilidad de los AKGs.
- (ii) La unión de AKGs a moléculas con un alto grado de bioaccesibilidad, de modo que se favorezca el reconocimiento de los AKGs en el tracto gastrointestinal.

2.1 Objetivo general

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y optimización del proceso de obtención de sistemas lipídicos basados en alquilglicerol, capaces de funcionar como vehículos de compuestos bioactivos con baja solubilidad intestinal para potenciar su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y actividad biológica.

2.1.1 Objetivos específicos

- (i) Optimización de la reacción de glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera* para la obtención de una mezcla de glicéridos con capacidad autoemulsionable, empleando estrategias englobadas dentro de los parámetros definidos por la Química Verde.
- (ii) Desarrollo de un modelo cinético de la reacción de glicerolisis de aceite de hígado de tiburón *quimera* catalizada por la lipasa de *Candida antarctica*, comparando la actividad específica hacia las distintas especies de la reacción y estimando el tiempo de inactivación enzimática.
- (iii) Caracterización física del sistema lipídico obtenido a partir de la reacción de glicerolisis enzimática del aceite de hígado de tiburón *quimera*, y estudio de la influencia de un

tratamiento térmico sobre el comportamiento polimórfico de los compuestos presentes en la mezcla.

- (iv) Optimización de la reacción de transfosfatidilación enzimática entre fosfatidilcolina y batil alcohol catalizada por la fosfolipasa D, para la obtención de un nuevo fosfolípido, el fosfatidilbatil alcohol, con potencial uso como lípido portador de compuestos bioactivos, mediante el empleo de un mecanismo de reacción basado en la eliminación de producto de reacción *in situ*.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Producción de un vehículo lipídico bioactivo a partir de la glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón quimera.

Marta Corzo-Martínez, Luis Vázquez, Pablo Arranz-Martínez, Nuria Menéndez, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. Production of a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis. *Food Bioprod. Process.* **2016**, 100, 311–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.08.003>

RESUMEN

El presente estudio muestra, por primera vez, la glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera* como método para la obtención de vehículos lipídicos bioactivos con potenciales propiedades auto-emulsionables. Las condiciones de reacción para la obtención de 34% (p/p) de monoglicérido, fueron el uso de 67% (p/p) de ciclopentanona como disolvente, 40 °C y una relación molar aceite:glicerina 1:1, en presencia de *Novozym 435*. De este modo, el proceso de glicerolisis se escaló a planta piloto, con resultados similares a los obtenidos a nivel laboratorio. Por último, se evaluó la influencia de la reacción de glicerolisis enzimática sobre el estado oxidativo del aceite de hígado de tiburón *quimera* durante las distintas etapas del proceso, mediante el cálculo del valor TOTOX, obtenido a partir del índice de peróxidos y *p*-anisidina. Los resultados obtenidos mostraron que no se produjo deterioro oxidativo del aceite. Así pues, a raíz del presente trabajo, se ha desarrollado un proceso eficiente, económicamente viable, respetuoso con el medioambiente y fácilmente escalable para la obtención de un sistema bioactivo de vehiculización lipídica a partir de aceite de hígado de tiburón *quimera*, con una potencial utilidad en la formulación de suplementos nutricionales y alimentos funcionales con alta biodisponibilidad y bioeficacia.



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Bioproducts Processing

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbpiChemE
ADVANCING
CHEMICAL
ENGINEERING
WORLDWIDE

Production of a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis

Marta Corzo-Martínez^a, Luis Vázquez^a, Pablo Arranz-Martínez^a,
Nuria Menéndez^a, Guillermo Reglero^{a,b}, Carlos F. Torres^{a,*}

^a Department of Production and Characterization of Novel Foods, Institute of Food Science Research (CIAL, CSIC-UAM), Madrid, Spain

^b Department of Production and Development of Foods for Health, IMDEA-Food Institute, CEI (UAM-CSIC), C/ Faraday 7, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2016

Received in revised form 28 June 2016

Accepted 5 August 2016

Available online 12 August 2016

Keywords:

Alkylglycerols

Bioactivity

Emulsifying systems

Enzymatic glycerolysis

Oxidative stability

Ratfish liver oil

ABSTRACT

This work shows, for the first time, the enzymatic glycerolysis of ratfish liver oil (RLO) as a method to obtain bioactive lipid carriers with potential self-emulsifying properties. Reaction conditions, leading to a 34% (w/w) of monoacylglycerol, were attained using 67% (w/w) of cyclopentanone as solvent, 40 °C, a molar ratio RLO to glycerol of 1:1 in the presence of Novozyme 435. Then, the glycerolysis process was scaled-up at pilot plant, with similar results to those obtained at laboratory scale. Finally, the effect of the enzymatic glycerolysis on the oxidative quality of ratfish liver oil was also evaluated determining peroxide, *p*-anisidine and TOTOX values along the different stages of the bioprocess. Results showed no deleterious effect of the glycerolysis process on the oil oxidative quality. Therefore, in the present work, an efficient, cost-effective, environmental friendly and easily scalable process of enzymatic glycerolysis has been developed to design a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil with potential application in the formulation of highly bioavailable and bioefficient nutritional supplements and functional foods.

© 2016 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Scientific knowledge about relevant aspects of nutrition intimately involved in the development and progression of several diseases, as cardiovascular diseases, cancer, etc., progresses rapidly. In this sense, a number of bioactive ingredients present in food products and other natural sources have shown promising effects as potential therapeutic/preventive agents in several *in vitro* assays. However, the clinical use of most of them is limited, as they do not show the same efficiency *in vivo*. The reason is their low water solubility, which leads to instability during gastric digestion, reducing the intestinal bioaccessibility and bioavailability (Sunil

et al., 2005; Pouton, 2006; Chengaiah et al., 2011; Kalepu et al., 2013; Aqil et al., 2013). This highlights the importance of developing new formulation strategies leading to improve these aspects. In the last decade, association to lipids, usually referred as lipid-based delivery systems (LDS), has gained much interest. Concretely, particular emphasis has been paid on self-emulsifying delivery systems (SEDS) (Pouton, 2000, 2006; Porter and Charman, 2001; Jannin et al., 2008; Chengaiah et al., 2011; Kalepu et al., 2013; Gupta et al., 2013).

SEDS are commonly manufactured using edible plant oils, with high content in medium chain fatty acids, which show high oxidative stability and solvent capacity and promote emulsification (Kalepu et al., 2013). Fish oils, with high

* Corresponding author. Fax: +34 910017905.

E-mail address: carlos.torres@uam.es (C.F. Torres).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.08.003>

0960-3085/© 2016 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

content in long chain fatty acids, are not usually used due to their lower stability against oxidation and self-dispersion capacity. However, liver oil of certain shark species (elasmobranch fishes), as ratfish liver oil (RLO) from *Hydrolagus colliei*, is an interesting and poorly studied alternative to plant oils. This possesses lower content in long chain fatty acids than other fish oils and, hence, higher oxidation stability is expected. The most important feature of this oil is, however, its exceptionally high content in alkylglycerols (AKG), the ether analogs of acylglycerols (Guney, 2002; Deniau et al., 2010). These have been the subject of much attention due to their special health-promoting effects in humans (Pugliese et al., 1998; Iannitti and Palmieri, 2010; Magnusson and Haraldsson, 2011), as anticarcinogenic and immunomodulatory among others (Andreesen, 1988; Palmblad et al., 1990; Berdel, 1991; Diomedea et al., 1993; Pédrone et al., 2004). Therefore, the use of RLO to design SEDS could have a double advantage: (i) to increase the bioaccessibility and adsorption of poorly water soluble bioactive compounds; and (ii) to provide additional beneficial effects or even have a synergistic effect with the loaded bioactive compound, giving rise to highly bioefficient formulations. This provides added-value to RLO that makes its use interesting despite to be less cost-efficient than plant oils. However, it has price comparable to other fish oils, such as tuna (20 €/L). Moreover, RLO is a commercial oil so it is easily supplied and its availability is relatively high, as it is not typically eaten by humans (the flesh is bland with an unpleasant aftertaste) and is not commercially caught with this purpose.

However, capacity of RLO to act as efficient lipid carrier is limited due to its poor digestibility. AKG contain one O-alkyl residue at sn-1 position of the glycerol backbone. This slight structural difference respect to TAG has been shown to affect significantly AKG bioaccessibility and, consequently, their capacity to act as lipid carriers (Martín et al., 2011). According to several works, digestible lipids have shown to be considerably more efficient enhancers of poorly soluble drug absorption, as compared to non-digestible lipids (Deckelbaum et al., 1990; Hauss et al., 1998; Martín et al., 2011; Gupta et al., 2013; Kalepu et al., 2013; Shrestha et al., 2014). This highlights the need of strategies that improves the digestibility, miscibility and solvent and emulsifying capacity of these lipids.

In this respect, enzymatic glycerolysis is of great interest for the production of lipid carriers. It leads to mixtures of tri-, di- and mono-acylglycerols with better miscibility and self-dispersion and emulsifying properties than the original oil. Likewise, glycerolysis products are similar to the natural end products of intestinal digestion and, hence, more biocompatible. Moreover, this process is industrially scalable and environmentally clean and uses lipases with high specificity and selectivity, leading to the production of pure, high-quality and biodegradable products with reduce formation of by-products and wastes (De Castro et al., 2004; Correia et al., 2011). Enzymatic glycerolysis has been extensively studied (Rosu et al., 1998; Otero et al., 2001). Several studies have reported MAG and/or DAG production by the glycerolysis of fish and vegetal oils catalyzed by different lipases (Weber and Mukherjee, 2004; Pawongrat et al., 2007; Correia et al., 2011; Feltes et al., 2012; Remonatto et al., 2015). However, to the best of our knowledge, no studies have aimed to use the enzymatic glycerolysis of ratfish liver oil (RLO) to obtain mixtures of acyl- and alkyl-glycerides with potential as bioactive and efficient lipid carriers.

Therefore, the aim of the present work was the development of an enzymatic glycerolysis process from RLO that

enables to obtain efficient, bioactive and bioaccessible emulsifying systems, which could be used in the formulation of nutritional supplements and functional foods of high bioavailability and bioefficacy. Moreover, scaled-up of the process at pilot plant can be considered as a good indicator for the feasibility of the process.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Ratfish liver oil (RLO) was kindly provided by Rosita RatfishOil® (Helgeland, Norway).

Food grade monoolein (99%) and solvents used in glycerolysis processes, including cyclopentanone (CPN), hexanal (HXL) and cyclopentyl-methyl-ether (CPME), were food grade flavoring agents and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glycerol was obtained from ICN Biomedicals (Aurora, OH). Biocatalysts as Novozym 435 (Nov435) (immobilized on acrylic resin, ≥ 5000 U/g according to manufacturer) (*Candida antarctica*) was kindly supplied by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Lipases PLG (*Alcaligenes* sp.) (immobilized on granulated diatomaceous earth, 100,000 U/g according to manufacturer), SL (*Burkholderia cepacia*) (non-immobilized, 700 U/g according to manufacturer) and TL (*Pseudomonas stutzeri*) (non-immobilized, 650 U/g according to manufacturer) were acquired from Meito Sangyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan), and lipase DF 15 (*Rizhopus oryzae*) (immobilized on imobead 150, ≥ 300 U/g according to manufacturer) was purchased from Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japan).

Regarding reagents used for chromatographic analysis, pure standards of oleic acid (99% purity), monoolein (99% purity) and batyl alcohol (99% purity) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), while pure standard of ethyl oleate (98% purity) was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). Isooctane was obtained from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). Hexane, methyl-tertbutyl ether (MTBE) and chloroform were obtained from Lab-Scan (Gliwice, Poland) and formic acid (98% purity) from Panreac (Barcelona, Spain). All these solvents were of HPLC grade.

2.2. Glycerolysis reaction

Lipase-catalyzed glycerolysis was carried out according to the method of Torres et al. (2002) with slight modifications. Briefly, 10 g RLO were added to a 120 mL flask containing 1 g of glycerol (RLO to glycerol molar ratio of 1:1). A stoichiometry relation of RLO and glycerol was used to prevent the presence of excess of one reactant in the product mixture. Mixture was thermostated at 40 °C with continuous agitation (200 rpm). Reaction was started with the addition of different commercial lipases in an enzyme to RLO ratio of 1:10 (w/w). Then, the flasks were stoppered and incubated in an orbital shaker at 200 rpm (IKA KS 4000 ic Control, Staufen, Germany). Evolution of glycerolysis reaction was determined by taking aliquots (50 μ L) from the reaction mixture periodically. All trials were allowed to proceed for 48 h and were done in duplicate.

2.3. Improvement of the glycerolysis process efficiency

Further glycerolysis reactions under the same conditions of agitation, temperature and time (continuous agitation at 200 rpm, 40 °C and for 48 h) were carried out as follows:

- (i) By adding food grade monoolein (MO) with GRAS (*Generally Recognized As Safe*) status to the initial reaction mixture, in a MO to RLO molar ratio of 1:1. Reaction was started with the addition of lipase and, in this case, based on the additional amount of MO in the initial reaction mixture, the enzymatic ratio (enzyme: RLO = 1.5:10, w/w) was higher as compared to that used in previous reactions without MO.
- (ii) In the presence of GRAS solvents, including CPN, HXL and CPME. To calculate the solvent volume needed, 1 mL aliquots of solvent were added successively until the complete dissolution of the glycerol present in the initial mixture reaction. Then, glycerol-solvent solutions were mixed with RLO in 250 mL flasks at the same molar ratio as solvent-free reactions (glycerol:RLO, 1:1). After mixing with RLO, glycerol became partially insoluble again, according to different authors (Damstrup et al., 2005, 2006, 2007), but system homogeneity remained higher than in the absence of solvent. Reaction was started with the addition of lipase and, in this case, in an attempt of counteracting the dilution effect of the solvent, the enzymatic charge (enzyme:RLO ratio = 1.25:10, w/w) was higher than that used in solvent-free systems. After reaction, solvent was eliminated from the reaction product through evaporation at 50 °C and under vacuum (~1 mbar) using a rotary evaporator RV 10 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) and an oil sealed rotary vacuum pump vacuum (Edwards, Spain distributor Iberica Vacuum, Madrid, Spain).
- (iii) With a RLO to glycerol molar ratio of 1:0.5 in the presence of the same volume of solvent than that used in case (ii) and also reducing the solvent to the half. For these experiments the enzymatic charge was the same as used in case (ii) (enzyme:RLO ratio = 1.25:10, w/w).

2.4. Analytical methods

2.4.1. Liquid chromatography with evaporative light scattering detection (LC-ELSD)

Chromatographic separation and quantitation of lipids present in the original sample of RLO and samples resulting from glycerolysis process was carried out by LC-ELSD. 50 µL aliquots withdrawn from the reaction mixture throughout the glycerolysis process were dissolved in 2 mL of chloroform and filtered (0.45 µm PVDF filters, Symta, Madrid, Spain). Afterwards, chloroform was evaporated at 40 °C under a nitrogen stream by using a Stuart Block Heater SBH200D/3 (Staffordshire, U.K.) until a constant weight residue was obtained. Finally, either sample of original RLO or samples resulting from enzymatic glycerolysis were diluted with chloroform to a final concentration of 20 mg/mL before injection (1 µL, ~20 µg of total lipids) in the LC system.

In the presence of GRAS solvents, 200 µL aliquots were centrifuged at 10,000 rpm for 3 min to eliminate possible enzyme residues. Then, 50 µL of supernatant were weighted and diluted 20-folds with chloroform before injection (1 µL, ~20 µg of total lipids) in the LC system.

LC analyses were carried out using an Agilent Technologies 1200 Series HPLC system (Santa Clara, CA, USA) containing a thermostated column compartment, a quaternary pump, an autosampler, a vacuum degasser, and evaporative light scattering detector (ELSD) (Agilent 1260 Infinity). Conditions of the ELSD were 2×10^5 Pa, 50 °C, and gain 4, which was adjusted

to accurately quantify minor compounds. Chromatographic separations were carried out on an Agilent Poroshell column (Sil 2.7 µm, 4.6 mm × 100 mm) at 35 °C, a flow rate of 2 mL/min and mixing eluents A (100% isooctane), B (0.02% (v/v) formic acid in isooctane:MTBE (50:50, v/v)) and C (MTBE:propan-2-ol (50:50, v/v)) to form a ternary gradient system as previously described by Torres et al. (2005). This methodology allows the simultaneous analysis up to 18 different neutral lipids classes, particularly diacylglycerol ether (DAGE), triacylglycerol (TAG), and their hydrolysis products (monoacylglycerol ether (MAGE), non-esterified alkylglycerol (Guney, 2002), monoacylglycerol (MAG), and diacylglycerol (DAG)), including different regioisomers, with very similar structure and polarity. The injection volume was 1 µL (~20 µg of total lipids). Data acquisition and processing were performed using Agilent ChemStation software (Agilent Technologies, Boeblingen, Germany).

Lipids in the reaction mixtures were identified by comparing their retention times (t_R) with those of different standard lipids. Commercial oleic acid and batyl alcohol were used for identification of free fatty acid (FFA) and AKG, respectively. DAGE and TAG were identified by using commercial RLO and menhaden fish oil (Mbanya et al., 2003). And finally, products derived from glycerolysis of menhaden fish oil and purified by semi-preparative HPLC were used for identification of MAGE, DAG and MAG. Quantitative analysis was performed by the external standard method, using calibration curves of each standard in the range 0.4–25 mg/mL. Relative standard deviation (RSD) values were below 10% in all cases.

Quantitative data were expressed as both, conversion of DAGE and TAG during the glycerolysis process (1), and percentage of each compound of the reaction mixture in weight respect to the total weight of the reaction mixture (2).

$$100 - \left[\left(\frac{\%_{\text{final}}}{\%_{\text{initial}}} \right) \times 100 \right] \quad (1)$$

$$\left[\frac{W_{\text{comp}}}{W_{\text{r.m}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

where %_{final} and %_{initial} are, respectively, the final and initial percentages of DAGE and TAG in the reaction mixtures, and W_{comp} and $W_{\text{r.m}}$ are the weight of each compound of the reaction mixture and the total weight of the reaction mixture, respectively.

Finally, the following defined parameters were used to assess the glycerolysis efficiency in terms of MAG production:

- (i) Yield (g MAG/100 g RLO) represents the mass of monoacylglycerol obtained during glycerolysis per unit mass of initial RLO.
- (ii) Productivity (g/kg/h) represents the concentration of MAG produced per unit of reaction time.

These parameters were evaluated at the time point when the maximum MAG concentration was achieved under the different glycerolysis conditions assayed.

2.4.2. Characterization of the starting ratfish liver oil by gas chromatography

Fatty acid (FA) profile of RLO was determined by gas chromatography with flame-ionization detector (GC-FID) prior methylation of the esterified fatty acid residues present in the sample. For this, 50 mg of RLO were dissolved with 1 mL of *n*-hexane (Lab-Scan, Gliwice, Poland). Then, 1 mL of 0.5 N

NaOH in methanol was added for sample methanolysis, followed by stirring for 1 min, heating at 100 °C for 5 min and further methylation by adding 1 mL of 14% BF₃ in methanol (Supelco, Pasadena, USA), stirring for 1 min and incubation at 100 °C for 5 min. The resulting mixture of fatty acid methyl esters (FAMES) was extracted with *n*-hexane (1 mL) and a saturated solution of NaCl (1 mL), after stirring for 2 min at room temperature. Decanted hexane phase was then allowed to stand for 2 h with anhydrous sodium sulfate (Panreac) for humidity elimination. Finally, hexane was evaporated until dryness at 40 °C under a nitrogen stream by using a Stuart Block Heater SBH200D/3 (Staffordshire, U.K.) to obtain a residue of FAMES which was then redissolved in *n*-hexane at a final concentration of 15 mg/mL. Chromatographic analysis of FAMES was performed on Agilent Technologies gas chromatograph (6850 N Network GC System) equipped with a flame ionization detector (FID). 1 µL of sample was injected in the split/splitless mode (split ratio 10:1) in a capillary column HP-88 ((88%-cyanopropyl) aryl-polysiloxane, 30 m × 0.25 mm × 0.20 µm thickness; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Helium was used as carrier gas at a flow rate of 0.9 mL/min. Injector and detector temperatures were 220 and 250 °C, respectively. The temperature program was as follows: starting at 50 °C and then heating to 180 °C at 20 °C/min; followed by heating from 180 to 220 °C at 15 °C/min. The final temperature (220 °C) was held for 10 min. For quantification, a calibration curve with ethyl oleate was made. Data acquisition and integration were done using Agilent ChemStation Rev. 4B.03.01 software (Wilmington, DE, USA). Analysis was carried out in duplicate and data were expressed as mean ± standard deviation (SD).

Molar mass of RLO was determined assuming all fatty acid are equally distributed among TAG and DAGE and using results from oil characterization by GC-FID and LC-ELSD. Firstly, FA profile determined by GC-FID allowed to calculate the average molecular weight of FA (AMW_{FA}) in RLO with following Eq. (3):

$$\sum \left(\frac{MW_{FA} \times \%}{100} \right) \quad (3)$$

where % is the relative abundance of each FA.

With AMW_{FA}, the MW of TAG and DAGE was calculated with Eqs. (4) and (5):

$$\text{TAG MW} = (3 \times \text{AMW}_{FA}) + 92 - (3 \times 18) \quad (4)$$

$$\text{DAGE MW} = (2 \times \text{AMW}_{FA}) + 344.57 - (2 \times 18) \quad (5)$$

where 92 is MW of glycerol molecule, 18 is MW of water molecule and 344.57 is MW of free or non-esterified alkylglycerol (AKG) molecule.

Finally, lipid profile determined by LC-ELSD allowed to know the percentage of TAG and DAGE, 20% and 80%, respectively. Thus, molar mass of RLO is:

$$(0.20 \times \text{TAG MW}) + (0.8 \times \text{DAGE MW}) \quad (6)$$

2.5. Scale-up to pilot plant

Glycerolysis reaction under the most suitable conditions determined at laboratory scale was scaled-up to pilot plant in a kiloclave reactor system (Buchi Glas Uster, Büchiglasuster, Switzerland). This was equipped with a jacketed pressure vessel of 1 L with a sight glass that allows the visual process

control and monitoring, thermostat for controlled heating, and mechanical stirring to ensure efficient mixing of reaction mixture. Process was carried out at atmospheric pressure, continuous agitation (200 rpm), 40 °C and the composition of the initial reaction mixture was adjusted to a final weight of ca. 500 g, consisting of 128 g RLO, 12.8 g glycerol and 304 g CPN. During reaction, lipase (12 g) was set in a basket, which is coupled to the agitation axis of the reactor and through which the reaction mixture circulates. The amount of lipase used as biocatalyst was limited by the basket capacity; so that the enzymatic charge (enzyme:RLO ratio=0.94:10, w/w) was lower than at lab scale. Similarly to lab scale, aliquots were withdrawn periodically from the reaction mixture in order to study the reaction kinetics. They were analyzed by LC-ELSD, as explained in Section 2.4.1. After 48 h of reaction, the reaction medium was emptied through the discharge valve of the reactor.

2.6. Determination of the oxidation status

To monitor the effect of glycerolysis process on oxidation degree of RLO, the peroxide value (PV) and the *p*-anisidine value (AnV) were determined as indicators of primary and secondary oxidation, respectively. The determination of both indicators, based on colorimetric reactions, was done through the measurement of the absorbance at 505 nm (PV) and 366 nm (AnV) using an Oxitester (CDR FoodLabFat, Florence, Italy) and following the manufacturer's instructions, which compliant to AOCS Official Methods Cd 8-53 (PV) and Cd 18-90 (AnV).

Moreover, the total oxidative deterioration was evaluated through the calculation of the TOTOX value with the following Eq. (7):

$$\text{TOTOX} = 2 \times \text{PV} + \text{AnV} \quad (7)$$

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows version 17.0. Univariate analysis of variance (ANOVA) (significant minimum difference, SMD, test) was used for the statistical evaluation of TAG and DAGE conversion and DAG, MAGE and MAG formation under the different glycerolysis conditions assayed. Differences were considered significant when *P* < 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Ratfish liver oil characterization

Table 1 shows the fatty acid (FA) profile of ratfish liver oil (RLO) determined by GC-FID. This was compared with FA profile of other fish (sardine, SO, and dogfish, DO, oils) (Klenk and Eberhagen, 1962; Olley and Duncan, 1965; Gruger et al., 1964) and vegetable oils (soybean, SbO, and olive oils, OO) (Gunstone, 1996), which are also used in glycerolysis. In general, content in saturated FA in RLO was similar to that of SO and DO and higher with respect to SbO and OO. The most remarkable differences were observed in monounsaturated and polyunsaturated FA contents. RLO showed 61.1% (w/w) of monounsaturated FA, which is substantially higher than that of SO (29.9%, w/w) and DO (34.9%, w/w). Similarly to OO, the major FA was oleic acid (43.3%, w/w). DO and SO, however, showed higher content in polyunsaturated FAs; 39.0% (DO) and 30.1% (SO) vs. 19.7% of RLO, so that higher oxidative oxidation

Table 1 – Fatty acid composition of ratfish liver oil (RLO), dogfish (DO), sardine oil (SO), olive oil (OO) and soybean oil (SbO).

Fatty acid methyl esters	Concentration (% w/w)				
	RLO	DO ^a	SO ^b	OO ^c	SbO ^d
Myristic acid (C14:0)	1.0	1.8	6.6	—	0.1
Palmitic acid (C16:0)	12.8	17.0	15.5	10.0	10.0
Palmitoleic acid (C16:1)	6.0	4.6	9.5	—	—
Hexadecadienoic acid (C16:2)	1.5	—	—	—	—
Hexadecatrienoic acid (C16:3)	1.9	—	—	—	—
Stearic acid (C18:0)	5.5	2.9	3.7	3.0	5.0
Oleic acid (C18:1)	43.3	16.1	17.3	78.0	43.0
Linoleic acid (C18:2)	—	2.2	2.5	7.0	51.0
Linolenic acid (C18:3)	4.0	—	1.3	1.0	7.0
Stearidonic acid (C18:4)	0.5	1.3	2.9	—	—
Eicosenoic acid (C20:1)	7.0	5.2	8.1	—	—
Arachidonic acid (C20:4)	1.2	2.7	2.5	—	—
Eicosapentaenoic acid (C20:5)	5.4	8.3	9.6	—	—
Erucic acid (22:1)	3.7	4.0	7.8	—	—
Docosapentaenoic acid (C22:5)	1.7	2.7	2.8	—	—
Docosahexaenoic acid (C22:6)	3.5	21.8	8.5	—	—
Nervonic acid (C24:1)	1.1	—	—	—	—
Total saturated FA	19.3	21.7	25.8	13.0	15.1
Total monounsaturated FA	61.1	29.9	34.9	78.0	43.0
Total polyunsaturated FA	19.7	39.0	30.1	8.0	58.0

^a Olley (1965); ^b Klenk (1962); ^{c,d} Gunstone (1996).

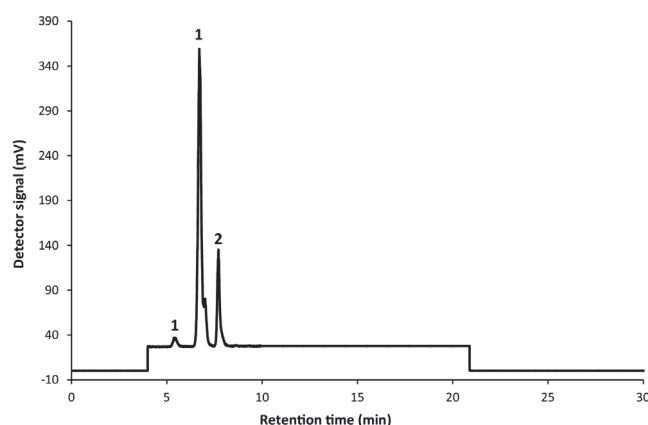


Fig. 1 – Chromatographic profile of lipids present in ratfish liver oil obtained by LC-ELSD. 1 = diacylglycerol ether (DAGE); 2 = triacylglycerol (TAG).

is expected. The most different FA profile was shown by SbO, with great content in linoleic acid (51%, w/w) and oleic acid (43%, w/w).

Likewise, according to LC-ELSD analysis (Fig. 1), original RLO was mainly comprised of two compounds, diacylglycerol ether (DAGE, peak 1, t_R = 6.7 min) and triacylglycerol (TAG, peak 2, t_R = 7.7 min). DAGE content of RLO (80%, w/w) was much higher than TAG content (20%, w/w). As commented above, this makes interesting the use of this oil as starting material in glycerolysis processes for the design of bioactive lipid delivery systems and distinguishes such processes from those carried out previously from vegetable oils or even from shark liver oil, with only 20% (w/w) of AKG.

3.2. Study of the catalytic activity of different commercial lipases during glycerolysis reactions in solvent-free systems

The aim of the glycerolysis process was to obtain mixtures of different proportions of minor glycerides and alkylglycerols

with higher polarity than starting DAGE and TAG and, hence, with higher emulsifying capacity. Several lipases have shown to be able to discriminate against DAGE (Fernández et al., 2013), affecting the reaction kinetics and, hence, the composition of the final product. Therefore, a previous study of the catalytic activity of different commercial lipases is needed to select biocatalyst with suitable activity and selectivity.

In the present work, up to five commercial lipases from different sources were assayed. To evaluate their catalytic activity, the parameter calculated was the reaction conversion. This variable was determined by the percentage of disappearance of the reactants, namely DAGE and TAG.

Table 2 shows the percentage of disappearance of DAGE and TAG after 48 h of reaction in the presence of the five lipases under study. All of them showed a similar activity against TAG and a conversion about 60% (w/w), respect to the initial TAG concentration, was observed after 48 h of reaction. However, two groups were clearly differentiated considering the rate of glycerolysis toward DAGE: group I (GI lipases), formed by Nov435, PLG and DF 15, which produced a DAGE conversion of 32–40% (w/w) after 48 h of reaction; and group II (GII lipases) consisting of lipases TL and SL, which led to a higher DAGE disappearance (~75%, w/w). These results suggest a lower discrimination against DAGE of lipases from group II. Initial rate of enzymatic reactions (after 4 h of reaction) was also determined and results (Table 2) support discrimination between different enzymes observed after 48 h of reaction.

Fig. 2 shows the chromatogram derived from LC-ELSD analysis of the final reaction mixture obtained after 48 h of glycerolysis in the presence of lipase TL as biocatalyst. This chromatogram includes, besides the reactants, DAGE (peak 1, t_R = 6.7 min) and TAG (peak 2, t_R = 7.7 min), the different products found in glycerolysis reactions, namely FFA (peak 3, t_R = 8.5 min), 1-MAGE (peak 4, t_R = 11.2 min), 1,2-DAG (peak 6, t_R = 14.2 min), AKG (peak 7, t_R = 17.2 min) and MAG (peak 8, t_R = 18.2 min). It should be pointed out that 2-MAGE and 1,3-DAG, formed mainly from 1,2-DAG by acyl migration,

Table 2 – Evolution of the lipid profile during the glycerolysis process at 40 °C in solvent-free systems (with and without MO) or in the presence of CPN (at laboratory and pilot plant scale). Data include the conversion of TAG and DAGE (% , in weight respect to their initial content) after 4 and 48 h of reaction; the formation of reaction products (% , in weight respect to the total weight of the reaction mixture); and the amount of unreacted glycerol at the end of the reaction (% , in weight respect to its initial content). Values shown as mean \pm SD ($n = 2$).

	Scale	Lipase	Conversion (% , w/w)				Formation (% , w/w)			Unreacted glycerol (% , w/w)
			4 h		48 h		48 h			
			TAG	DAGE	TAG	DAGE	MAGE + DAG	MAG	AKG	
Solvent-free systems	Laboratory	Nov435	34.45 ± 3.80 ^a	14.16 ± 1.70 ^a	67.11 ± 1.45 ^a	39.36 ± 2.47 ^a	40.13 ± 1.19 ^a	6.36 ± 0.14 ^a	0.34 ± 0.08 ^a	40.85 ± 0.56 ^a
		PLG	43.36 ± 2.10 ^b	18.09 ± 2.02 ^a	59.94 ± 0.96 ^b	32.23 ± 0.76 ^b	36.40 ± 0.34 ^b	2.60 ± 0.17 ^b	0.10 ± 0.02 ^b	n.d [*]
		DF 15	42.76 ± 1.95 ^b	15.98 ± 1.43 ^a	57.19 ± 1.23 ^b	31.39 ± 0.85 ^b	35.70 ± 0.34 ^b	2.10 ± 0.01 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	n.d
		TL	49.41 ± 0.02 ^c	50.89 ± 2.21 ^b	64.23 ± 0.65 ^c	74.85 ± 0.33 ^c	53.11 ± 0.28 ^c	7.4 ± 0.33 ^a	2.30 ± 0.12 ^d	41.07 ± 0.71 ^a
Solvent-free systems with MO	Laboratory	SL	56.62 ± 0.00 ^d	39.58 ± 1.54 ^c	62.87 ± 0.01 ^c	73.51 ± 0.49 ^c	54.71 ± 0.98 ^c	9.0 ± 0.19 ^c	1.80 ± 0.09 ^e	n.d
		Nov435	0.0 ± 0.00 ^e	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^d	10.91 ± 0.67 ^d	22.54 ± 0.55 ^d	2.10 ± 0.01 ^b	6.36 ± 0.14 ^f	94.17 ± 5.09 ^b
		TL	11.04 ± 0.13 ^f	51.66 ± 1.20 ^b	24.77 ± 0.24 ^e	76.68 ± 1.95 ^c	52.41 ± 1.26 ^c	7.35 ± 0.03 ^a	2.60 ± 0.17 ^d	60.60 ± 4.93 ^c
Systems with CPN	P.P ^{**}	Nov435	65.97 ± 1.81 ^g	39.11 ± 1.35 ^c	100.0 ± 0.00 ^f	68.72 ± 0.82 ^e	44.29 ± 1.22 ^e	33.56 ± 2.06 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	21.84 ± 1.92 ^d
		TL	2.34 ± 0.20 ^h	1.07 ± 0.57 ^f	76.31 ± 0.32 ^g	33.60 ± 0.49 ^b	31.96 ± 0.86 ^f	17.72 ± 0.26 ^e	0.44 ± 0.03 ^a	70.02 ± 0.28 ^e
		Nov435	55.05 ± 0.94 ^d	37.52 ± 1.07 ^c	98.45 ± 0.35 ^g	75.15 ± 0.15 ^c	44.16 ± 0.34 ^e	32.14 ± 0.55 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	22.54 ± 3.11 ^d
^{a-h} Different case letters within a column indicate statistically significant (<i>P</i> < 0.05) differences.										
[*] n.d = not determined.										
^{**} P.P = pilot plant.										

^{a-h} Different case letters within a column indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences.

^{*} n.d = not determined.

^{**} P.P = pilot plant.

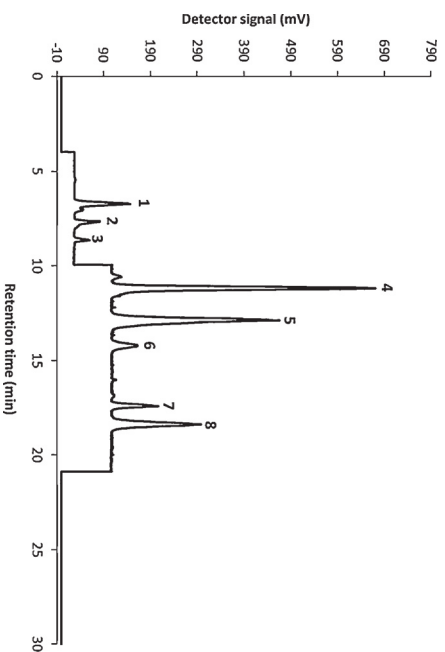


Fig. 2 – LC-ELSD profile of reaction mixture obtained upon the glycerolysis reaction at 40 °C for 48 h in the presence of lipase TL as biocatalyst. 1 = DAGE; 2 = TAG; 3 = FFA; 4 = 1-MAGE; 5 = 2-MAGE + 1,3-DAG; 6 = 1,2-DAG; 7 = AKG; 8 = MAG.

showed identical retention time in our HPLC method (peak 5, $t_R = 12.9$ min).

The percentage of appearance of these compounds was also used to study the reaction kinetics. Fig. 3 shows the time

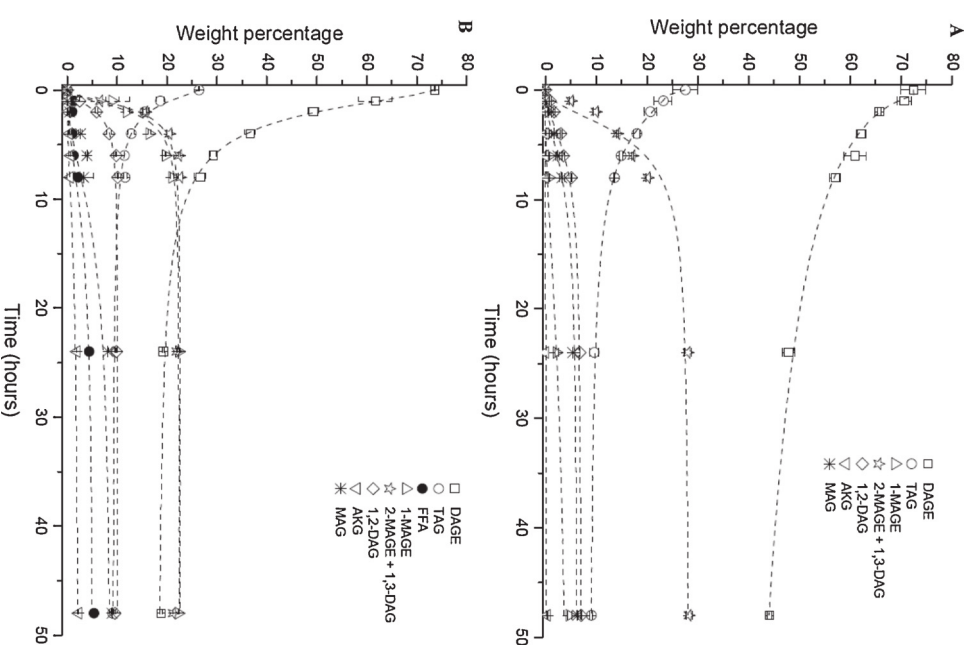


Fig. 3 – Time course of the disappearance of DAGE and TAG and the appearance of FFA, MAGE, DAG, AKG and MAG during glycerolysis at 40 °C for 48 h in the presence of Novozyme 435 (A) and lipase TL (B) as biocatalysts. Vertical bars represent SD ($n = 2$).

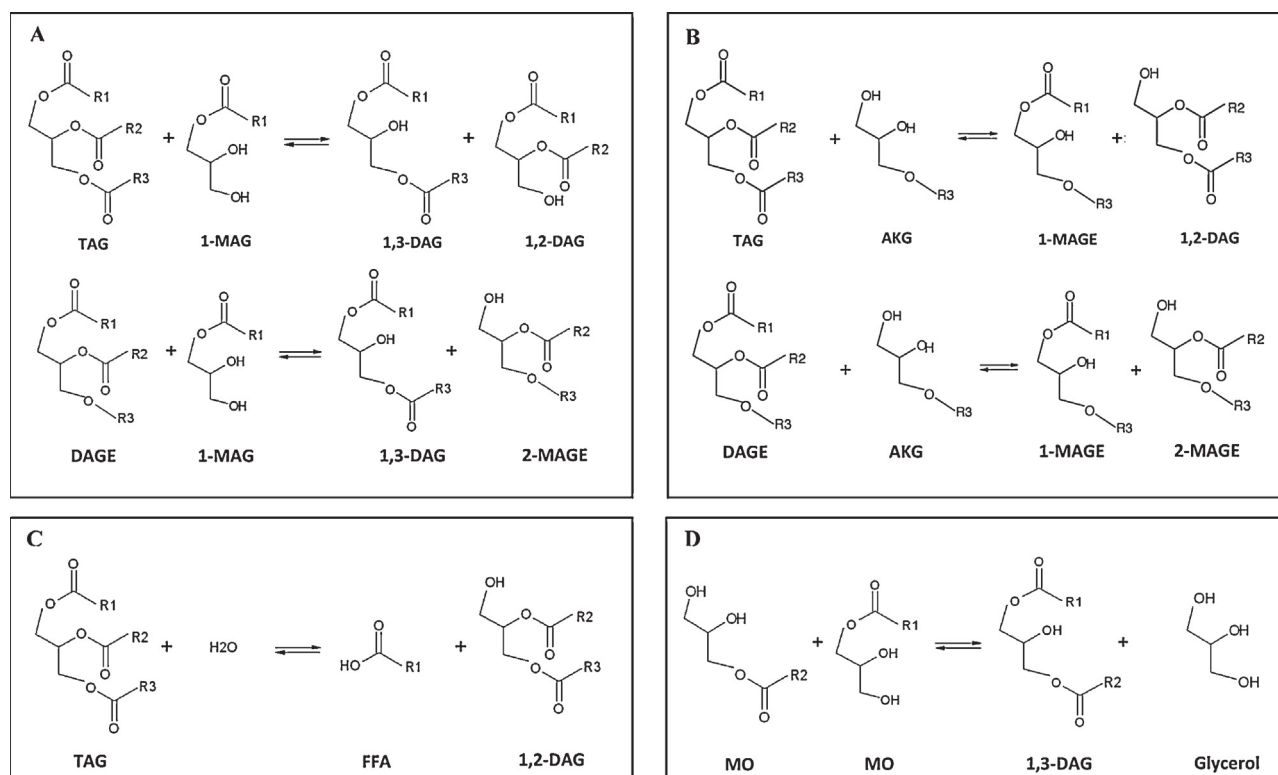


Fig. 4 – Secondary reactions that may occur along the bioprocess: interesterification reaction between a molecule of TAG or DAG and one of MAG (A); interesterification reaction between a molecule of TAG or DAG and one of AKG (B); hydrolysis of a molecule of TAG (C); interesterification reaction between two molecules of MO (D).

course of the production of MAGE, DAGE, DAG and MAG in the presence of Nov435 (Fig. 3A) and lipase TL (Fig. 3B) as biocatalysts. Similar patterns were observed for reactions catalyzed by the other lipases of group I (PLG and lipase DF 15) and II (lipase SL) (data not shown).

For reactions catalyzed by both GI and GII lipases, MAGE and DAG were the major glycerolysis products. However, different trends in the formation of these products were observed depending on the biocatalyst. Thus, the formation of MAGE, DAG, MAG and AKG was significantly ($P < 0.05$) faster with GII lipases than with GI lipases, reaching a maximum after ca. 8 h (Fig. 3B) and 24 h (Fig. 3A), respectively.

Under the experimental conditions assayed in the present work (RLO:glycerol molar ratio, 1:1), accumulation of MAG and AKG in the reaction mixture should be observed. However, for all the studied lipases, DAG and MAGE contents remained fairly constant (without significant ($P < 0.05$) changes) until the end of the reaction once the plateau was achieved (Fig. 3) and, the content in MAG and AKG never exceeded 9% (w/w) (Table 2). This result could indicate that, besides glycerol, MAG and AKG produced react with DAGE and TAG to give DAG and MAGE (Fig. 4A and B), which explains that the content in these species remains constant throughout the process. The higher solubility of MAG and AKG as compared to that of glycerol could be an explanation of their preferential use as acyl acceptors during the glycerolysis reaction.

Self-emulsification is generally obtained at surfactant contents above 30% (w/w) (Chengai et al., 2011). The main glycerolysis product usually acting as surfactant is the monoacylglycerol (MAG) portion. So the potential as self-emulsifying systems of the glycerolysis mixtures obtained directly depends on its content. Under reaction conditions studied so far, the maximum production yield (in weight respect to the initial amount of RLO) and productivity of MAG

were obtained with GII lipases (11.2%, w/w, and 14 g/kg/h, respectively). Under such conditions, a final glycerolysis product with a maximum MAG content of 9% (w/w) was obtained, which is not high enough for good emulsifying properties. For this reason further increase of the glycerolysis rate is required.

Selection of the most efficient biocatalyst plays an important role in the process improvement; however, experiments developed so far with GI and GII lipases do not allow discard any of them, as both groups of enzymes show pros and cons. The lower conversion rate observed in the presence of GI lipases may be related to that these enzymes are immobilized onto a solid support while GII lipases are in soluble form (powder). Several authors have observed that enzymatic carrier may limit the diffusion of some substrates to the enzyme active site, leading to a lower biocatalytic activity as observed for GI lipases. However, immobilized lipase enzymes offer several benefits over enzymes in soluble form, including efficient recovery and separation of reaction product, higher catalyst productivity for cost-efficiency, can be recycled for cost savings, enhanced stability from heat, organic solvents or autolysis, and convenient and safer handling. With GII lipase (soluble), the interaction of DAGE and TAG with the lipase active site is favored, which explains their higher conversion rate as compared to GI lipases. However, as observed in Fig. 3B, when soluble GII lipases were used as biocatalysts, TAG hydrolysis (Fig. 4C) was also promoted releasing up to a 5% (w/w) FFA (as a consequence of undesirable hydrolysis reaction). The presence of FFA in the final reaction product makes necessary a subsequent purification step for FFA removal that could complicate the scale-up of the glycerolysis process.

Therefore, with the purpose of determining the glycerolysis conditions that lead to a final product with at least 30% (w/w) MAG and do not promote the TAG hydrolysis, further experiments were carried out with the two lipases (one from

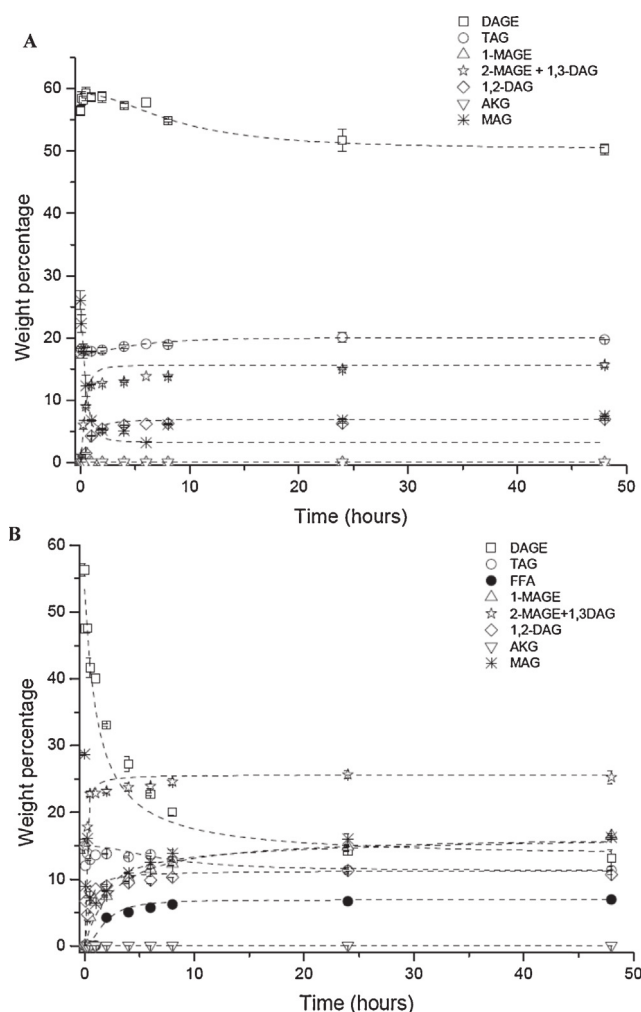


Fig. 5 – Time course of DAG, TAG, FFA, MAGE, DAG, AKG and MAG concentration during glycerolysis at 40 °C for 48 h catalyzed by Novozyme 435 (A) and lipase TL (B) in the presence of monoolein as surfactant. Vertical bars represent SD ($n = 2$).

each group) that produced higher MAG percentages, namely Nov435 (group I) and lipase TL (group II).

3.3. Improvement of substrate conversion in monoacylglycerol during glycerolysis

According to Khor et al. (2010), the low miscibility between the glycerol and the oil phase is the highest drawback in glycerolysis reactions. In this sense, increasing glycerol miscibility in the reaction mixture could improve the reaction system homogeneity and, hence, the reaction conversion.

In the present work, two different strategies were studied: (i) the addition of a surfactant to the initial reaction mixture, concretely food grade monoolein (MO); and (ii) the development of the bioprocess in the presence of organic solvents generally used as food flavorings with GRAS status. Finally, once an adequate glycerolysis reaction conversion was reached, a second adjustment of the glycerol content was carried out.

3.3.1. Effect of the addition of GRAS monoolein

Fig. 5 shows the time course of the glycerolysis reaction, in the presence of Nov435 (Fig. 5A) and lipase TL (Fig. 5B). Similar to results obtained in the absence of MO, DAG conversion

was higher with lipase TL than in the presence of Nov435 as biocatalyst. However, notable differences were observed in the behavior of TAG and DAG in the presence of MO.

The initial content in MO dropped sharply with Nov435 and lipase TL, probably due to a quick transesterification reaction between highly soluble molecules of MO, leading to the formation of 1,3-DAG and glycerol (Fig. 4D). This explains the fast increase observed at short reaction times with both biocatalysts in the content of 1,3-DAG (starry symbols) (Fig. 5). On the contrary, no conversion of TAG throughout the glycerolysis process catalyzed by the two assayed lipases was observed, suggesting that both MO and 1,3-DAG produced, could had an inhibition effect of enzyme.

Because of the preferential reaction between MO molecules and the inhibition of the biocatalytic activity, the addition of MO to the initial reaction mixture did not increase efficiently the MAG yield (in weight respect to the initial amount of RLO) and productivity, the following values being obtained: 8.1% (w/w) and 10.1 g/kg/h with Nov435 and 17.7% (w/w) and 22.2 g/kg/h with lipase TL. Consequently, MAG concentration in the final reaction mixture (7.5% (w/w) with Nov435 and 16% (w/w) with lipase TL) was still too low for good emulsifying properties of the product mixture. Similarly, Vázquez et al. (2016) did not find any improvement in the efficiency of echium oil glycerolysis when they used food grade MO as surfactant, followed by a homogenization process of mixture oil + MO. Glycerolysis with Nov435 lipase as biocatalyst has been also developed in the presence of other food grade surfactants, such as sodium (bis-2-ethylhexyl) sulfosuccinate and Tween 60, 80 or 85 (Fiametti et al., 2009a,b; Santos et al., 2013). However, conversion of TAG in MAG was too high (>55%), which can induce gastrointestinal irritation (Chengaiyah et al., 2011).

3.3.2. Effect of the use of GRAS solvents

In a second attempt to improve the glycerol dispersion in the reaction mixture, glycerolysis was developed in the presence of organic solvents. Suitable solvents for this work were chosen based on Henderson's work (Henderson et al., 2011), searching for solvents with high melting and boiling points, and low toxicity, environmental impact and production of volatile organic compounds (VOCs). Thus, cyclopentanone (CPN) and hexanal (HXL), which are organic solvents usually used as flavoring additives with GRAS status, and cyclopentyl-methyl ether (CPME), which is considered safer and less harmful to the environment than other commonly utilized organic solvents, were selected.

The use of this kind of solvents has undergone an important increase in recent years with the aim of developing efficient and respectful processes with the environment, also called Green Chemistry processes.

The three solvents under study were selected due to their different polarity or LogP and, hence, different capacity of dissolving glycerol. In this respect, HXL, with the highest hydrophobic character (2.37 LogP) of the three solvents under study, showed a very low capacity of glycerol dispersion, as a very high volume of HXL (>90% in weight respect to the total weight of the mixture) was required to dissolve the glycerol present in the initial reaction mixture (0.8 g). Similarly, despite its higher polarity (1.59 LogP), the volume of CPME needed to dissolve glycerol of the initial reaction mixture was also too high, this representing 83% (w/w) of the total weight of the mixture. The high volume of CPME used to dissolve glycerol resulted in lower volumetric

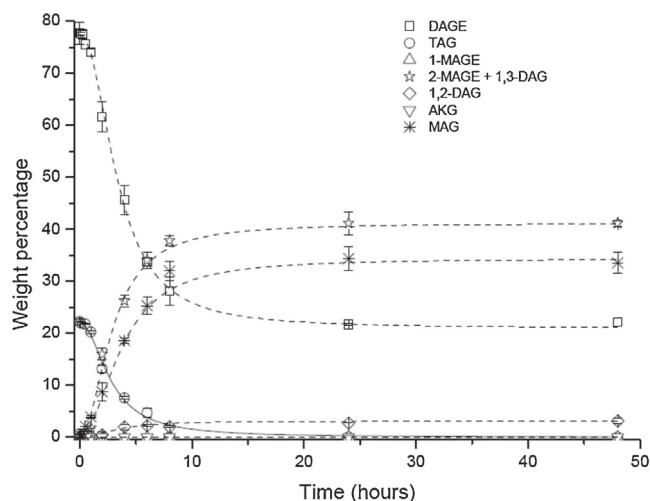


Fig. 6 – Time course of DAGE, TAG, MAGE, DAG, AKG and MAG concentration during glycerolysis at 40 °C for 48 h catalyzed by Novozyme 435 in the presence of cyclopentanone (CPN). Vertical bars represent SD (n = 2).

productivity of the reaction mixture, lower conversion of DAGE ($3.66 \pm 0.44\%$, w/w) and TAG ($10.44 \pm 1.05\%$, w/w), and scarce formation of MAG ($3.37 \pm 0.28\%$, w/w). This could be attributed to the dilution of the substrates and the biocatalyst in the reaction mixture. Moreover, the use of high amounts of solvent makes more laborious the solvent removal from the final product. Therefore, the use of HXL and CPME was discarded.

Cyclopentanone, with 0.45 Log P, was the solvent with the highest polarity of the three solvents under study and, therefore, it should disperse the glycerol more easily than HXL and CPME. Effectively, the use of CPN to improve the glycerolysis efficiency resulted to be a viable strategy, as only 67% of the total weight of the mixture was necessary to dissolve completely the glycerol of the initial reaction mixture.

Fig. 6 depicts the time course of the disappearance of DAGE and TAG and the production of MAGE, DAG and MAG in the presence of Nov435 as biocatalyst and CPN. As observed, total conversion of TAG and a loss of 65% of initial DAGE were observed after 8 h of reaction, which are conversion values significantly ($P < 0.05$) better than those obtained with Nov435 in the absence of CPN (Table 2). Moreover, in the presence of CPN, the rate of MAGE, DAG and MAG formation was increased. As observed, a plateau was achieved after ca. 8 h, no significant ($P < 0.05$) differences between values obtained after 8, 24 and 48 h being observed. However, as indicated above, in the absence of solvent (Fig. 3A), the maximum formation of glycerolysis products occurred at ca. 24 h. In general, the content of glycerolysis products in the final product was also increased, according to the higher conversion of DAGE and TAG; however, the most interesting result was the great increase observed in the production yield of MAG (29.7% in weight respect to the initial amount of RLO), productivity (37.2 g/kg/h), and concentration in the final reaction mixture (34% in weight respect to the total weight of the reaction mixture).

In reaction catalyzed by lipase TL, however, TAG had not completely disappeared and just the 33.6% (w/w) of the initial DAGE was converted to minor glycerides and alkylglycerols after 8 h of reaction. Likewise, the MAG content in the final glycerolysis mixture was only 17% (w/w) (Table 2). This could be attributed to the apparition of visible lipase aggregates in the presence of CPN, which hindered the access of DAGE and

TAG to the enzyme active site, reducing their conversion rate (data not shown). In addition, up to 4% (w/w) of FFA, resulting from TAG hydrolysis was detected in the final product. The formation of such aggregates might be also favored by the higher enzymatic amount utilized in systems with CPN as compared to solvent-free systems. Because all of this, lipase TL was discarded as suitable biocatalyst for glycerolysis of RLO and Nov435 was selected as the most appropriated enzyme to achieve the objective of this work. In addition, the use of the immobilized Nov435 instead of powder lipase TL provides further advantages, as it may allow the application of continuous and automated processes, an accurate control of the reaction extension, the easy separation of product, the stabilization of the enzymatic activity, as well as the easy recovery and reutilization of the catalyst (Santos et al., 2013; Skoronski et al., 2014).

3.3.3. Study of the unreacted glycerol amount at the final glycerolysis product

The conversion of glycerol under all the studied conditions of glycerolysis was theoretically calculated based on reaction stoichiometry. Table 2 shows the calculated percentage of unreacted glycerol in the final glycerolysis mixtures obtained after 48 h of reaction with Nov435 and lipase TL as biocatalysts and in solvent-free systems, with and without MO, or in the presence of CPN. In solvent-free systems without MO, no important differences were observed between values of unreacted glycerol after reaction with Nov435 and lipase TL. The addition of MO resulted in a notable reduction of the glycerol conversion, particularly with Nov435, according to the low values of DAGE and TAG conversion and MAGE, DAG and MAG formation observed under these conditions (Fig. 5). For systems with CPN, a high percentage of unreacted glycerol with lipase TL was also determined, related to the enzymatic aggregation in the presence of solvent and the subsequent loss of activity, as commented above. When Nov435 was used as biocatalyst in the presence of CPN, a remarkable reduction of the unreacted glycerol amount in the final glycerolysis product was observed, in agreement with the higher reaction efficiency previously observed (Fig. 6) in terms of conversion of DAGE and TAG in MAGE, DAG and MAG.

Once found the glycerolysis conditions leading to the highest formation of MAG and before the scaled-up of the process, the effect on reaction kinetics of the RLO:glycerol:CPN in the initial reaction mixture was studied in an attempt to further improve the reaction rate. For that, further reactions with a RLO to glycerol molar ratio of 1:0.5 in the presence of 67% CPN (w/w) and the half of it (33.5%, w/w) were developed. As observed in Table 3, a lower conversion of DAGE and TAG and formation of MAGE, DAG and MAG was observed when CPN and, particularly, glycerol amount of the initial reaction mixture was reduced as compared to data obtained with a RLO to glycerol molar ratio of 1:1 and 67% CPN. These results highlighted especially the importance of the glycerol content in the initial reaction mixture, as it determines the reaction kinetics and, hence, the composition of the final glycerolysis product. For these reasons it was not possible to reduce the amount of glycerol and CPN used.

Based on all the results obtained at laboratory scale, the best reaction conditions, leading to a product mixture with more than 30% (w/w) MAG and negligible amounts of FFA, were: 40 °C, RLO to glycerol molar ratio of 1:1, Nov435 as biocatalyst and 67% (w/w) of CPN.

Table 3 – Percentages of disappearance of reactants and appearance of reaction products as a function of the RLO/glycerol molar ratio and CPN volume. Values shown as mean \pm SD ($n = 2$).

		RLO:glycerol molar ratio/% CPN	
		1:0.5/67%	1:0.5/33.5%
Conversion (% w/w)	DAGE	52.62 \pm 0.34 [*]	49.89 \pm 0.26 [*]
	TAG	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00
Formation (% w/w)	2-MAGE + 1,3-DAG	45.76 \pm 0.59	36.22 \pm 0.23 [*]
	1,2-DAG	0.00 \pm 0.00	9.57 \pm 0.07 [*]
	MAG	16.64 \pm 0.32 [*]	16.42 \pm 0.03 [*]

* Significant ($P < 0.05$) differences with respect results obtained after 48 h of reaction with Nov435 as biocatalyst, RLO to glycerol molar ratio of 1:1 and 67% (w/w) of CPN (Table 1).

3.4. Evaluation of the glycerolysis process feasibility at pilot plant scale

Under the best reaction conditions determined at laboratory scale, glycerolysis process was developed at pilot plant scale with the purpose of studying the process feasibility as well as the biocatalyst and CPN recovery from the final product mixture by evaporation under vacuum.

A reaction mixture consisting of 128 g RLO, 12.8 g glycerol and 304 g CPN was used in this trial. After the glycerolysis reaction, 382.6 g and 120.6 g of product (before and after solvent evaporation, respectively), were recovered. This value represents 92.4% in weight respect to the initial product. Likewise, after evaporation process, 255 g of CPN (93.9% in weight respect to the amount of solvent in the initial reaction mixture) were recovered, which can be reused in subsequent trials of glycerolysis reaction.

Fig. 7, slight differences on reaction kinetics were also observed between the reaction carried out at lab scale and at pilot plant scale under the same conditions. Thus, whereas at lab scale the maximum conversion of DAGE and TAG and formation of MAGE, DAG and MAG reached a plateau after ca. 8 h of reaction, remaining fairly constant until the end of the reaction, at pilot plant scale, a first stage of fast disappearance of DAGE and TAG and appearance of MAGE, DAG and MAG until ca. 8 h was also observed; however, a plateau was not

achieved, but conversion of DAGE and TAG and formation of MAG followed at a lower rate until the end of the reaction. As commented in Section 2.6, during glycerolysis process at pilot plant scale in the kiloclave, lipase was set in a basket, through which the reaction mixture circulates. At lab scale, lipase was in suspension in the reaction mixture and, in addition, the enzyme to RLO ratio was higher than at pilot plant scale. This could explain the slightly slower reaction rate observed when reaction was carried out at pilot plant scale.

Despite these differences in the reaction kinetics, DAGE and TAG conversion and MAGE, DAG and MAG content of the final glycerolysis product obtained in the “kiloclave” reactor were very similar to those obtained at the laboratory (Table 2). Moreover, the percentage of unreacted glycerol at the end of the bioprocess (22.54 ± 3.11) was also similar to that observed at laboratory scale (21.84 ± 1.92).

Further reaction trials at pilot plant scale reutilizing the same batch of enzyme and CPN are needed to ensure the feasibility of the process. However, findings derived from this preliminary scale-up study suggested that the glycerolysis process from RLO and catalyzed by Nov435 in the presence of CPN is easily scalable to pilot plant, which may be indicative of its industrial feasibility aimed to the design of bioactive self-emulsifying systems.

3.5. Evaluation of the effect of the glycerolysis process on RLO oxidation degree

Lipid oxidation leads to the development of unpleasant taste, off-flavor and undesirable changes in quality of the oil, decreasing its nutritional value and stability during storage and compromising its safety because of the formation of toxic compounds. Oxidative quality of oils is, therefore, a determinant factor of their shelf life and their final use, so that its determination is highly important.

Oxidative quality of RLO was monitored during the glycerolysis process by means of the measurement of values of peroxide (PV), *p*-anisidine (AnV) and TOTOX index ($2PV + AnV$, Eq. (3)) in the starting RLO and the glycerolysis products obtained with Nov435 as biocatalyst in solvent-free systems and in the presence of CPN. According to the Codex Alimentarius (CODEX STAN 19-1981), maximum PV, AnV and TOTOX allowed for commercialization of edible fats and oils are 10 mequiv. O_2 /kg, 20 AnV and 26 mequiv. O_2 /kg, respectively. As observed in Table 4, oxidation values of the starting RLO were higher than the maximum allowed values, indicating that it was an unrefined crude oil. Regarding the effect of the glycerolysis process on its oxidative quality, it should be noted that oxidation values decreased after glycerolysis,

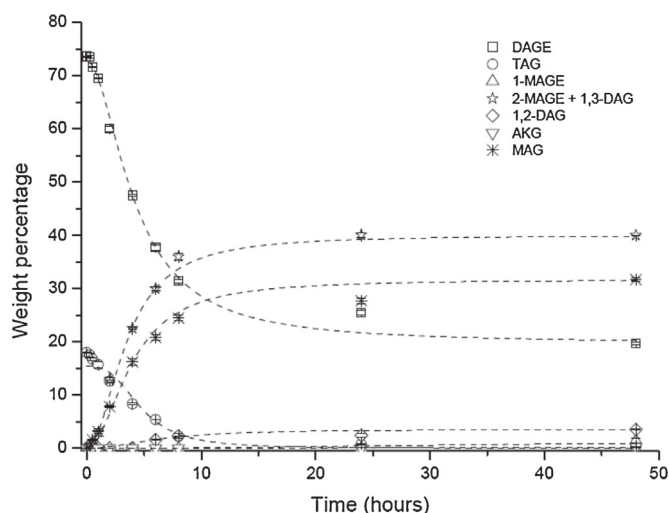


Fig. 7 – Time course of DAGE, TAG, MAGE, DAG, AKG and MAG concentration at pilot plant scale during glycerolysis under conditions previously selected at laboratory (40 °C, 48 h, RLO:glycerol molar ratio = 1:1, Nov435 as biocatalyst, and 67% CPN). Vertical bars represent SD ($n = 2$).

Table 4 – Peroxide, *p*-anisidine and TOTOX values of starting ratfish liver oil (RLO) and once subjected to the glycerolysis reaction in solvent-free systems (with and without MO) or in the presence of CPN (at lab and pilot plant scale). Values shown as mean \pm SD ($n=2$).

			Peroxide (mEO/kg)	<i>p</i> -Anisidine (AnV)	TOTOX
Glycerolysis products	Starting material		16.59 \pm 1.92 ^a	4.53 \pm 0.23 ^a	40.3
	Laboratory scale	Solvent-free systems	9.00 \pm 0.82 ^b	7.20 \pm 0.6 ^b	25.2
		System with CPN	13.95 \pm 0.71 ^c	2.60 \pm 0.00 ^c	30.5
	Pilot plant scale	System with CPN	10.00 \pm 0.18 ^b	4.85 \pm 0.35 ^a	24.8

^{a-c} Different case letters within a column indicate statistically significant ($P < 0.05$) differences.

particularly after CPN removal at pilot plant scale. Under these conditions, a product with oxidation values lower than the maximum allowed was obtained.

These results suggested that glycerolysis conditions used in the present work, especially in the presence of CPN, preserve and even improve these oxidation values of the final product. A refining stage of the starting RLO, however, should be done to further improve the oxidative quality of the product and make it more adequate for human consumption (Valério et al., 2010).

4. Conclusions

This work describes for the first time the development of an enzymatic glycerolysis process to be used for the efficient formulation of potential self-emulsifying systems from RLO, with a high content in biologically active alkylglycerols.

Reaction conditions leading to a system with 34% (w/w) of MAG and, hence, with potential emulsifying systems were 40 °C, RLO to glycerol molar ratio of 1:1, use of immobilized commercial lipase Nov435 as biocatalyst and 67% of CPN. Glycerolysis process under these conditions was easily scaled-up to pilot plant, without significant differences in reaction kinetics compared to results obtained at lab scale. In addition, results from oxidation status indicated that glycerolysis process does not affect the oil oxidative quality.

Based on results of this work, it can be concluded that the developed process of enzymatic glycerolysis is an efficient, cost-effective, environmental friendly and easily scalable method for the design of potential self-emulsifying systems from ratfish liver oil, with a high content of bioactive alkylglycerols, which can be used to formulate nutritional supplements and functional foods of high bioavailability and bioefficacy.

Acknowledgements

This study has been funded by Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD, project number S2013/ABI-2728) and by Ministerio de Economía y Competitividad (project number AGL2013-48943-C2-1-R). Pablo Arranz-Martínez and Marta Corzo-Martínez also thank Ministerio de Economía y Competitividad and the European Social Fund: BES-2014-070395 for a pre-doctoral FPU grant and a Juan de la Cierva contract, respectively.

References

- Andreesen, R., 1988. Ether lipids in the therapy of cancer. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 22, 118–131.
- Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., Vadhanam, M.V., 2013. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Lett.* 334, 133–141.

- Berdel, W.E., 1991. Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs. *Br. J. Cancer* 64 (2), 208–211.
- Chengaiyah, B., Alagusundaram, M., Ramkanth, S., Madhusudhana, C.C., 2011. Self-emulsifying drug delivery system: a novel approach for drug delivery. *Res. J. Pharm. Technol.* 4 (2), 175–181.
- Correia, A.C.V.B., Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, M.S.L., 2011. Produção de emulsionantes através da glicerólise de óleo de bagaço de azeitona catalisada pela lipase da *Candida Rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano. *Millennium* 41, 7–15.
- Damstrup, M.L., Jensen, T., Sparsø, F.V., Kiil, S.Z., Jensen, A.D., Xu, X., 2005. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (8), 559–564.
- Damstrup, M.L., Abildskov, J., Kiil, S., Jensen, A.D., Sparsø, F.V., Xu, X., 2006. Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis. *J. Agric. Food Chem.* 54 (19), 7113–7119.
- Damstrup, M.L., Kiil, S., Jensen, A.D., Sparsø, F.V., Xu, X., 2007. Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. *J. Agric. Food Chem.* 55 (19), 7786–7792.
- De Castro, H.F., Mendes, A.A., Santos, J.C., Aguiar, C.L., 2004. Modification of oils and fats by biotransformation. *Quim. Nova* 27, 146–156.
- Deckelbaum, R.J., HamUton, J.A., Moser, A., Bengtsson-Olivecrona, G., Butbul, E., Carpentier, Y.A., et al., 1990. Medium-chain versus long-chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: implications for the mechanisms of lipase action. *Biochemistry* 29 (5), 1136–1142.
- Deniau, A.L., Mosset, P., Le Bot, D., Legrand, A.B., 2010. Which alkylglycerols from shark liver oil have anti-tumour activities? *Biochimie* 93 (1), 1–3.
- Diomedea, L., Colotta, F., Piovani, B., Re, F., Modest, E.J., Salmons, M., 1993. Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-RAC-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action. *Int. J. Cancer* 53 (1), 124–130.
- Feltes, M.M.C., Villeneuve, P., Barea, B., Barouh, N., Oliveira, J.V., Oliveira, D., et al., 2012. Enzymatic production of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from fish oil in a solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 1057–1065.
- Fernández, O., Vázquez, L., Reglero, G., Torres, C., 2013. Discrimination against diacylglycerol ethers in lipase-catalysed ethanolysis of shark liver oil. *Food Chem.* 136, 464–471.
- Fiametti, K.G., Rovani, S., Oliveira, D., Corazza, M.L., Treichel, H., Oliveira, J.V., 2009a. Assessment of variable effects on solvent-free monoacylglycerol enzymatic production in AOT surfactant. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110 (6), 510–515.
- Fiametti, K.G., Rovani, S., Oliveira, D., Corazza, M.L., Treichel, H., Oliveira, J.V., 2009b. Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil in aerosol-OT surfactant. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2), 708–712.
- Guney, A.A., 2002. Synthesis of controlled-release products in supercritical medium. *AIChE J.* 48 (4), 856–866.

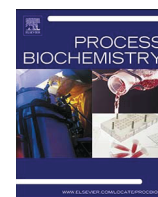
- Gupta, S., Kesarla, R., Omri, A., 2013. *Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems*. *ISRN Pharm.* 2013, 1–16.
- Gruger Jr., E.H., Nelson, R.W., Stansby, M.E., 1964. Fatty acid composition of oils from 21 species of marine fish, freshwater fish, and shellfish. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41, 662–667.
- Gunstone, F.D., 1996. Fatty acids—nomenclature, structure, isolation and structure determination, biosynthesis and chemical synthesis. In: *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Blackie, London, pp. 1–34.
- Hauss, D.J., Foga1, S.E., Ficorilli, J.V., Price, C.A., Roy, T., Jayaraj, A.A., Keirns, J.J., 1998. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB4 inhibitor. *J. Pharm. Sci.* 87 (2), 164–169.
- Henderson, R.K., Jiménez-González, C., Constable, D.J.C., Alston, S.R., Inglis, G.G.A., Fisher, G., et al., 2011. Expanding GSK's solvent selection guide—embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. *Green Chem.* 13, 854–862.
- Iannitti, T., Palmieri, B., 2010. An update on the therapeutic role of alkylglycerols. *Mar. Drugs* 8 (8), 2267–2300.
- Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D., 2008. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 734–746.
- Kalepu, S., Manthina, M., Padavala, V., 2013. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm. Sinica B* 3 (6), 361–372.
- Khor, G.K., Sim, J.H., Kamaruddin, A.H., Uzir, M.H., 2010. Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification. *Bioresour. Technol.* 101, 6558–6561.
- Klenk, E., Eberhagen, D., 1962. About the composition of the fatty acid mixture of various fish oils. *Z. Physiol. Chem.* 328, 180–188.
- Magnusson, C.D., Haraldsson, G.G., 2011. Ether lipids. *Chem. Phys. Lipids* 164 (5), 315–340.
- Martín, D., Morán-Valero, M., Señoráns, F., Reglero, G., Torres, C., 2011. *In vitro* intestinal bioaccessibility of alkylglycerols versus triacylglycerols as vehicles of butyric acid. *Lipids* 46 (3), 277–285.
- Mbanya, J.C., Mfopou, J.K., Sobngwi, E., Mbanya, M.D., Ngogang, J.Y., 2003. Metabolic and hormonal effects of five common African diets eaten as mixed meals: the Cameroon study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (4), 580–585.
- Olley, J., Duncan, W.R.H., 1965. Lipids and protein denaturation in fish muscle. *J. Sci. Food Agric.* 16, 99–104.
- Otero, C., Arcos, J.A., Berrendero, M.A., Torres, C., 2001. Emulsifiers from solid and liquid polyols: different strategies for obtaining optimum conversions and selectivities. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11, 883–892.
- Palmblad, J., Samuelsson, J., Brohult, J., 1990. Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50 (4), 363–370.
- Pawongrat, R., Xu, X., H-Kittikun, A., 2007. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem.* 104, 251–258.
- Pédrone, F., Martin, B., Leduc, C., Le Lan, J., Saïag, B., Legrand, P., et al., 2004. Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumour in mice. *Nutr. Cancer* 48, 64–69.
- Porter, C.J., Charman, W.N., 2001. *In vitro* assessment of oral lipid based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50 (Suppl. 1), S127–S147.
- Pugliese, P.T., Jordan, K., Cederberg, H., Brohult, J., 1998. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *J. Altern. Complement. Med.* 4 (1), 87–99.
- Pouton, C.W., 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl. 2), S93–S98.
- Pouton, C.W., 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 278–287.
- Remonato, D., Santin, C.M.T., Valério, A., Lerin, L., Batistella, L., Ninow, J.L., et al., 2015. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean and canola oils in a free organic solvent system assisted by ultrasound. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1615-1>.
- Rosu, R., Iwasaki, Y., Shimidzu, N., Doisaki, N., Yamane, T., 1998. Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 4, 191–198.
- Santos, J.S., Dors, G., Oliveira, D., Blanco, S.F.M.M., Oliveira, J.V., Furigo Junior, A., et al., 2013. Glycerolysis of fish oil catalyzed by a commercial lipase from *Rhizomucor miehei* in reaction media containing food grade surfactant. *Quim. Nova* 36, 46–51.
- Shrestha, H., Bala, R., Arora, S., 2014. Lipid-based drug delivery systems. *J. Pharm.* 2014, 1–10.
- Skoronski, E., Padoin, N., Soares, C., Furigo Jr., A., 2014. Stability of immobilized *Rhizomucor miehei* lipase for the synthesis of pentyl octanoate in a continuous packed bed bioreactor. *Braz. J. Chem. Eng.* 31, 633–641.
- Sunil, P., Maru, O., Chan, M., 2005. Novel lipid-based formulations enhancing the *in vitro* dissolution and permeability characteristics of a poorly water-soluble model drug, piroxicam. *Int. J. Pharm.* 301, 209–216.
- Torres, C., Lin, B., Hill Jr., C.G., 2002. Lipase-catalyzed glycerolysis of an oil rich in eicosapentaenoic acid residues. *Biotechnol. Lett.* 24, 667–673.
- Torres, C.F., Vázquez, L., Señoráns, F.J., Reglero, G., 2005. Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *J. Chromatogr. A* 1078 (1–2), 28–34.
- Valério, A., Rovani, S., Treichel, H., de Oliveira, D., Oliveira, J., 2010. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent free systems. *Bioprocess Biosyst Eng.* 33, 805–812.
- Vázquez, L., Jordán, A., Reglero, G., Torres, C.F., 2016. A first attempt into the production of acylglycerol mixtures from echium oil. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (208), 1–11.
- Weber, N., Mukherjee, K.D., 2004. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5347–5353.

3.2. Glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón quimera en un reactor de tipo tanque agitado: una estimación cinética.

Pablo Arranz-Martínez, Marta Corzo-Martínez, Luis Vázquez, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. Lipase catalyzed glycerolysis of ratfish liver oil at stirred tank basket reactor: A kinetic approach. *Process Biochem.*, **2018**, 64, 38-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.026>.

RESUMEN

Se ha estudiado la cinética de la reacción de glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera* catalizada por la lipasa *Novozym 435* a escala planta piloto. Se ha desarrollado un modelado derivado del mecanismo de Michaelis-Menten para describir la tasa de desaparición de triglicérido y de alquilglicerol diesterificado. Se observó una discriminación positiva de la lipasa inmovilizada frente a la conversión de alquilglicerol diesterificado en los distintos sets de experimentos realizados, determinando que la conversión de triglicéridos se realizaba 1.5 veces más rápida que la de alquilglicerol diesterificado. Se estudió la reutilización del biocatalizador en un reactor con agitación mediante celdilla, para la determinación de la inactivación enzimática. Se utilizó un modelo de primer orden para ajustar los datos experimentales, llevando a cabo tres sets distintos de glicerolisis enzimática. En todos los casos, se observó una rápida inactivación de la lipasa inmovilizada. La vida media de *Novozym 435* en las condiciones de reacción estudiadas fue aproximadamente 145 h, lo que es indicativo de un efecto de deterioro de dichas condiciones de reacción. Tras la reutilización de la lipasa durante 5 ciclos de 24 h de duración, el biocatalizador se lavó con una mezcla hexano/etanol 50/50 p/p, sin embargo, este proceso no fue válido para la recuperación de la actividad enzimática.



Lipase catalyzed glycerolysis of ratfish liver oil at stirred tank basket reactor: A kinetic approach

Pablo Arranz-Martínez^a, Marta Corzo-Martínez^a, Luis Vázquez^a, Guillermo Reglero^{a,b}, Carlos F. Torres^{a,*}

^a Department of Production and Characterization of Novel Foods, Institute of Food Science Research (CIAL, CSIC-UAM), C/Nicolas Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

^b Department of Production and Development of Foods for Health, IMDEA-Food Institute, CEI (UAM-CSIC), C/Faraday 7, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Enzyme reutilization
Glycerolysis
Kinetics
Lipase
Ratfish liver oil
Alkylglycerol

ABSTRACT

The kinetics of the lipase (Novozym 435) catalyzed glycerolysis of ratfish liver oil has been studied at pilot plant scale. A model derived from a generalized Michaelis–Menten mechanism was developed to describe the rates of disappearance of triacylglycerols and diacylglycerol ethers. Positive discrimination of the immobilized lipase against diacylglycerol ether was accurately determined in the different data sets studied. More than 1.5 times faster glycerolysis of triacylglycerol compared to that of diacylglycerol ethers was observed in each set of experiments investigated. Reutilization of the same batch of the biocatalysts was carried out in a stirred tank basket reactor to evaluate the enzyme inactivation. A first-order model for deactivation of the lipase was fit to the data sets. Three different sets of enzymatic glycerolysis were carried out. In all cases rapid inactivation of the immobilized lipase was observed. The half life of Novozym 435 under the glycerolysis conditions studied was approximately 145 h which indicates a deleterious effect of the reaction conditions assayed on lipase activity. After 5 lipase reutilizations of 24 h each, lipase was washed with hexane/ethanol 50/50 w/w but original lipase activity could not be fully restored.

1. Introduction

Glycerol backbone is the basic chemical structure of glycerolipids that contain alkyl chains linked by different bond types. Hence, based on the number of chains linked to the glycerol, glycerolipids can be grouped into three categories: triacyl-, diacyl- and monoacyl-glycerols. When this alkyl chain is bonded to the glycerol by an ether linkage this type of glycerolipid is called alkylglycerol or glyceryl ether.

Different alkylglycerols (AKG) namely, monoacylglycerol ethers (MAGE), diacylglycerol ethers (DAGE), alkylglycerophospholipids and their derivatives are commonly known also as ether lipids. These substances have attracted much attention because of their beneficial biological activities in humans [1–3]. Antineoplastic [4], antimetastatic activity and induction of differentiation and apoptosis in cancer cells [5,6] have been attributed to alkylglycerols. Moreover, immune system boost properties have also related to dietary ingestion of these substances [7]. It has been recently reported that these compounds could also enhance bioaccessibility and bioavailability of other substances, such as butyric or omega-3 fatty acids [8,9].

Concentration of AKG by a two-step methodology based on chemical ethanolysis of shark liver oil followed by SFE to purify the

product mixture has been reported [10]. In this chemical transformation, no discrimination between DAGE and triacylglycerols (TG) was found. In order to modify mainly the TG, reducing the biotransformation of glyceryl ether present in shark liver oils, enzymatic technology has showed very interesting capabilities [11]. Lipase discrimination between very similar lipid structures have been broadly studied [12]. Most of these studies are based on the concentration of certain fatty acids or groups of fatty acids utilizing hydrolysis, esterification and transesterification reactions [13–15]. Besides, enzymatic glycerolysis, that can be defined as an alcoholysis utilizing glycerol as acyl-acceptor in the presence of an adequate biocatalyst has been extensively studied [16–18] for the production of MG and/or DG of both animal and vegetal oils catalyzed by different lipases [17,19–22]. Recently, our research group have studied the enzymatic glycerolysis of ratfish liver oil (RLO) to obtain mixtures of acyl- and alkyl-glycerides with potential as bioactive and efficient lipid carriers [23].

To the best of our knowledge, lipase discrimination between DAGE and TG in glycerolysis reactions has not been accurately determined. For this reason, this study pretends to develop a kinetics modelling for lipase-catalyzed glycerolysis reactions, to establish numerically the discrimination of *Candida antarctica* lipase between DAGE and TG.

* Corresponding author.

E-mail address: carlos.torres@uam.es (C.F. Torres).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.026>

Received 18 July 2017; Received in revised form 21 September 2017; Accepted 24 September 2017

Available online 28 September 2017

1359-5113/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Moreover, kinetics data from scaled-up at pilot-plant of this bioprocess reutilizing the same batch of immobilized lipase in three different set of trials have been utilized to validate the developed mathematical modeling and to determine the rate of inactivation of the lipase at this particular reaction conditions.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ratfish liver oil (RLO) was purchased to Phosphotech (Saint-Herblain Cedex, France). The initial peroxide (mEq of O_2 /kg) and anisidine values of RLO were 16 and 4, respectively. Cyclopentanone (CPN) categorized as food grade flavoring agent, was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glycerol was purchased from ICN Biomedicals (Aurora, OH). Novozym 435 (Nov435) (Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin contained 5000 Units/gram according to manufacturer) was kindly supplied by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Regarding reagents used for chromatographic analysis, batyl alcohol (99% purity) was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isooctane was obtained from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). Hexane, metyl-tertbutyl ether (MTBE) and chloroform were obtained from Lab-Scan (Gliwice, Poland) and formic acid (98% purity) from Panreac (Barcelona, Spain). All these solvents were of HPLC grade.

2.2. Glycerolysis reaction

Glycerolysis reactions were carried out at 40 °C in a 1-L stainless steel reactor coupled to a paddle stirrer at 200 rpm (Kiloclave, Buchi Glass Uster, Switzerland), according to the methodology previously described [23]. Briefly, in the first trial of each set of experiments, 12 g of fresh immobilized Lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435) were introduced into a basket with 100 μ m mesh size and coupled to the stirrer. Then, 128 g RLO, 12.8 g glycerol and 304 g CPN were added to the reactor to begin the glycerolysis reaction. Similarly to our previous work [23], in order to improve reaction conversion and increase system homogeneity, CPN categorized as food grade flavoring agent, was utilized as organic solvent in the reaction mixture. In these glycerolysis reactions the process downstreaming is greatly simplified because the basket retains the biocatalyst that is readily available for the next trial, and the product mixture, free of enzyme, is released at the end of each glycerolysis trial by the discharge valve. Two sets of experiments were carried out to study the reaction kinetics and validate the developed mathematical modeling; one of them consisted of 5 glycerolysis trials of 48 h each, and the other one was comprised of 10 trials of 24 h each. The same batch of lipase was reutilized for all trials of each experimental set, accumulating a total working time of 240 h in both of them.

An additional set of ten consecutive 24 h trials was attempted to study the influence of the lipase washing on enzymatic inactivation. In this set of glycerolysis reactions, after five consecutive trials of 24 h reutilizing the same batch of lipase, the enzyme was removed from the reactor basket, washed with a mixture of hexane and ethanol 50/50 w/w, and dried under vacuum. Then the washed lipase was placed again in the reactor basket and five consecutive 24 h-trials were effected with the washed lipase.

Kinetics of each glycerolysis trial was determined by taking aliquots (200 μ L) from the reaction mixture periodically (0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 and 48 h). At least two samples for each reaction time were taken and analyzed.

2.3. Analysis of glycerolysis products by liquid chromatography with evaporative light scattering detection (LC-ELSD)

Chromatographic separation and quantification of lipids present in

the original sample of RLO and samples resulting from glycerolysis process was carried out by LC-ELSD. 50 μ L aliquots from the reaction mixtures were weighted and diluted 20-folds with chloroform before injection (injection volume 1 μ L, \approx 20 μ g of total lipids) in the LC system. LC analyses were carried out using an Agilent Technologies 1200 Series HPLC system (Santa Clara, CA, USA) containing a thermostated column compartment, quaternary pump, auto-sampler, vacuum degasser, and evaporative light scattering detector (ELSD) (Agilent 1260 Infinity). Conditions of the ELSD were 3.5×10^5 Pa, 50 °C, and initial gain 4. The gain was also adjusted along the analysis to accurately quantify minor compounds. Chromatographic separations were carried out on an Agilent Poroshell column (Sil 2.7 μ m, 4.6 mm \times 100 mm) at 35 °C, a flow rate of 2 mL/min and mixing eluents A (100% isooctane), B (0.02% (v/v) formic acid in isooctane:MTBE (50:50, v/v)) and C (MTBE:propan-2-ol(50:50, v/v)) to form a ternary gradient system as previously described [24]. This methodology allows the simultaneous analysis up to 18 different neutral lipids classes, particularly diacylglycerol ether (DAGE), triacylglycerol (TG), and their hydrolysis products (monoacylglycerol ether (MAGE), non-esterified alkylglycerol, monoacylglycerol (MG), and diacylglycerol (DG)), including different regioisomers, with very similar structure and polarity. Data acquisition and processing were performed using Agilent ChemStation software (Agilent Technologies, Boeblingen, Germany). Lipids in the reaction mixtures were identified by comparing their retention times (t_R) with those of different standard lipids. Commercial oleic acid and batyl alcohol were used for identification of free fatty acid (FFA) and AKG, respectively. DAGE and TG were identified by using commercial RLO and menhaden fish oil. And finally, products derived from glycerolysis of menhaden fish oil and purified by semi-preparative HPLC were used for identification of MAGE, DG and MG. Quantitative analysis was performed by the external standard method, using calibration curves of each standard in the range 0.4–25 mg/mL. Relative standard deviation (RSD) values were below 10% in all cases. Quantitative data were expressed in mM concentration.

2.4. Rate of glycerolysis

Schematic representation of the glycerolysis reaction for TG and DAGE from RLO is shown in Fig. 1.

The rate-limiting step is the incorporation of glycerol and formation of the activated form of the enzyme and the MG. The rest of the steps are considered in pseudo-steady state. This mechanism also assumes that the glycerolysis reaction of DG, MAGE and MG are negligible. From Fig. 1 it is possible to develop rate expressions similar to those proposed by Malcata et al. [25] and by Lessard and Hill [26] for lipase catalyzed hydrolysis reactions, and by Torres et al. [27] for lipase catalyzed ethanolysis reactions.

The main differences with respect to the original model proposed by Malcata et al. [25] are: 1) the rate expressions contain the concentration of glycerol rather than the concentration of water; 2) a term for the

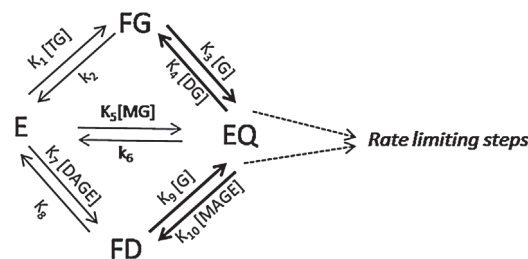


Fig. 1. Schematic representation of the glycerolysis reaction. E = enzyme, TG = reactant triacylglycerol, DAGE = reactant diacylglycerol ether, G = glycerol, MG = monoacylglycerol, DG = diacylglycerol, MAGE = monoacylglycerol ether, FG = complex between the enzyme and the triacylglycerol, FD = complex between the enzyme and the diacylglycerol ether, EQ = activated form of the enzyme and monoacylglycerol. k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 , k_7 , k_8 , k_9 , and k_{10} are rate constants.

reverse of the glycerolysis reaction is incorporated in the rate expressions.

The concentration of the different enzyme intermediates formed is:

$$[FG] = [E][TG] \frac{k_1}{k_2} \quad (1)$$

$$[EQ] = [E][MG] \frac{k_5}{k_6} \quad (2)$$

$$[FD] = [E][DAGE] \frac{k_7}{k_8} \quad (3)$$

Hence, total enzyme concentration can be expressed as:

$$[E_T] = [E] + [FG] + [EQ] + [FD] \quad (4)$$

Replacing Eqs. (1), (2), and (3) in Eq. (4) and re-grouping, an expression for [E] can be obtained:

$$[E_T] = [E] + [E][TG] \frac{k_1}{k_2} + [E][MG] \frac{k_5}{k_6} + [E][DAGE] \frac{k_7}{k_8} \quad (5)$$

$$[E] = \frac{[E_T]}{1 + [TG] \frac{k_1}{k_2} + [MG] \frac{k_5}{k_6} + [DAGE] \frac{k_7}{k_8}} \quad (6)$$

Where E = enzyme, FG = activated form of the enzyme and the native ester bond, EQ = activated form of the enzyme and the monoacylglycerol, k_1 – k_{10} are rate constants.

[TG], [DG], [DAGE], [MAGE], and [MG] are the molar concentrations of the triacylglycerol, diacylglycerol, diacylglycerol ether, monoacylglycerol ether, and monoacylglycerol, respectively. [G] denotes the concentration of glycerol.

The rate of disappearance of TG is defined by the following expression:

$$-r_{TG} = [FG][G]k_3 - [EQ][DG]k_4 \quad (7)$$

By substitution of Eqs. (1) and (2) into Eq. (7):

$$-r_{TG} = [E][TG][G] \frac{k_1}{k_2} k_3 - [E][MG][DG] \frac{k_5}{k_6} k_4 \quad (8)$$

Introducing Eq. (6) into Eq. (8) yield:

$$-r_{TG} = \frac{[E_T]([TG][G] \frac{k_1}{k_2} k_3 - [MG][DG] \frac{k_5}{k_6} k_4)}{1 + [TG] \frac{k_1}{k_2} + [MG] \frac{k_5}{k_6} + [DAGE] \frac{k_7}{k_8}} \quad (9)$$

At this point, it should be mentioned that three different models can be used to fit the experimental data sets. A first model that includes only parameters for the forward reaction, i.e. $-r_{TG} = [E_T][TG][G] \frac{k_1}{k_2} k_3$ and it does not account for either inhibition effects or the reversibility of the reaction. A second model, containing additional parameters related to the reversibility of the reaction, but omitting inhibition effects i.e. $-r_{TG} = [E_T]([TG][G] \frac{k_1}{k_2} k_3 - [MG][DG] \frac{k_5}{k_6} k_4)$; and a third model corresponding to Eq. (9) that incorporates the effects of both inhibition and the reversibility of the reaction.

In addition, with the purpose of reducing the number of dependent variables involved, the following simplifications were carried out:

$$[DG] = [TG_0] - [TG] \quad (10)$$

$$[MAGE] = [DAGE_0] - [DAGE] \quad (11)$$

Incorporation of Eq. (10) into Eq. (9) yield:

$$-r_{TG} = \frac{[E_T]([TG][G] \frac{k_1}{k_2} k_3 - [MG][TG_0] \frac{k_5}{k_6} k_4 + [MG][TG] \frac{k_5}{k_6} k_4)}{1 + [TG] \frac{k_1}{k_2} + [MG] \frac{k_5}{k_6} + [DAGE] \frac{k_7}{k_8}} \quad (12)$$

The rate expressions r_{TG} of the model simplified by reparametrization following the approach of Malcata et al. [25] yield:

$$-r_{TG} = \frac{dTG}{dt} = \frac{\Theta_I [TG][G] + \Theta_{II} [TG][MG] - \Theta_{III} [MG]}{1 + \Theta_{VII} [TG] + \Theta_{VIII} [MG] + \Theta_{IX} [DAGE]} \quad (13)$$

The same approach was utilized for the rate expression

$$-r_{DAGE} = [FD][G]k_9 - [EQ][MAGE]k_{10} \quad (14)$$

$$-r_{DAGE} = [E][DAGE][G] \frac{k_7}{k_8} k_9 - [E][MG][MAGE] \frac{k_5}{k_6} k_{10} \quad (15)$$

$$-r_{DAGE} = \frac{[E_T]([DAGE][G] \frac{k_7}{k_8} k_9 - [MG][MAGE] \frac{k_5}{k_6} k_{10})}{1 + [TG] \frac{k_1}{k_2} + [MG] \frac{k_5}{k_6} + [DAGE] \frac{k_7}{k_8}} \quad (16)$$

$$-r_{DAGE} = \frac{[E_T]([DAGE][G] \frac{k_7}{k_8} k_9 + [MG][DAGE] \frac{k_5}{k_6} k_{10} - [MG][DAGE_0] \frac{k_5}{k_6} k_{10})}{1 + [TG] \frac{k_1}{k_2} + [MG] \frac{k_5}{k_6} + [DAGE] \frac{k_7}{k_8}} \quad (17)$$

$$-r_{DAGE} = \frac{dDAGE}{dt} = \frac{\Theta_{IV} [DAGE][G] + \Theta_V [DAGE][MG] - \Theta_{VI} [MG]}{1 + \Theta_{VII} [TG] + \Theta_{VIII} [MG] + \Theta_{IX} [DAGE]} \quad (18)$$

Considering that it has been previously reported for similar kinetics models, that the effects of reversibility must be accounted for, but inhibition effects can be neglected [27], and also to avoid over-parameterization, the following rate expressions were utilized to fit the experimental data:

$$-r_{TG} = \frac{dTG}{dt} = \Theta_I [TG][G] + \Theta_{II} [TG][MG] - \Theta_{III} [MG] \quad (19)$$

$$-r_{DAGE} = \frac{dDAGE}{dt} = \Theta_{IV} [DAGE][G] + \Theta_V [DAGE][MG] - \Theta_{VI} [MG] \quad (20)$$

The [MG], [DG] and [MAGE] were also estimated from the [TG] and [DAGE] predicted by the proposed kinetics model, assuming that:

$$[MG]_{\text{estimated}} = ([TG_0] - [TG]_{\text{predicted}}) + ([DAGE_0] - [DAGE]_{\text{predicted}}) \quad (21)$$

$$[DG]_{\text{estimated}} = ([TG_0] - [TG]_{\text{predicted}}) \quad (22)$$

$$[MAGE]_{\text{estimated}} = ([DAGE_0] - [DAGE]_{\text{predicted}}) \quad (23)$$

Being [TG₀] and [DAGE₀] the initial concentration of TG and DAGE.

Then, the estimated concentrations of [MG], [DG] and [MAGE] were depicted with the experimental values of [MG], [DG] and [MAGE]. Unfortunately experimental [MAGE] could not be satisfactorily determined by HPLC because of the lack of an adequate analytical standard for HPLC quantification. Instead experimental [MAGE] was determined according to the following equation:

$$[MAGE]_{\text{experimental}} = ([DAGE_0] - [DAGE]_{\text{experimental}}) \quad (24)$$

Parameter estimates were obtained by fitting the kinetic data to Eqs. (19) and (20) using MicroMath Scientist for Windows (version 3.01, MicroMath Research, Salt Lake City, UT).

2.5. Loss of enzyme activity with time

Thermal deactivation is the loss of enzyme activity over time as a consequence of thermal effects. Knowledge of the rate law governing the deactivation process is crucial in enzyme-catalyzed processes. For the purpose of modeling, deactivation is usually assumed that occurs in a single step. This implies that deactivation of the active enzyme (E) to an inactive form (E_d) obeys first-order kinetics:



The mode in which the enzyme activity changes with time is then given by:

$$a\{t\} = a_0 \exp[-k_d(t - t_0)] \quad (26)$$

where t is time; t_0 is the time at which the first experiment with a

particular batch of enzyme is started; $a\{t\}$ is the activity of the enzyme at a particular time t ; a_0 is the activity of the enzyme at time t_0 ; and k_d is the first order deactivation rate constant. One of the problems that arise when one tries to evaluate the loss of enzyme activity in stirred tank reactors is the fact that the time of the reaction and the time at which the set of experiments was started are equivalent. This fact does not allow distinguish the rate of the reaction from the rate at which the enzyme is losing activity. In order to overcome this problem, the data sets were obtained using several trials of glycerolysis reaction with the same batch of lipase in order to differentiate between the times characteristic of the two types of reaction (glycerolysis and deactivation). Each cycle involves the same elapsed time for the glycerolysis reaction but by reutilizing the same batch of lipase, the elapsed time will differ from the time during which the lipase has been susceptible to deactivation ($t-t_0$). The mathematical model used in the analysis of the data thus can account for the effect of deactivation of the enzyme in the rate expressions for the glycerolysis of TG and DAGE.

To characterize the loss of enzyme activity, the most relevant variable is the elapsed time since the start of the experiments ($t-t_0$). The amounts of MG produced from the precursor triacylglycerol and diacylglycerol ether depend not only on the time these species are in contact with the lipase, but also on the enzymatic activity profile during the time that batch is being processed. Graphical depictions of the reaction rate in each trial can be used to determine the activity of the lipase in each reutilization.

Assuming first-order reaction rate, the disappearance of TG along the reaction time can be linearized by representing $\frac{\ln[TG]}{\ln[TG_0]}$ versus reaction time. The slope of this curve for each lipase reutilization can be considered as the activity of the lipase at this particular trial.

The reaction rate constant calculated at each trial, $a\{t\}$ can be utilized to characterize the loss of enzyme activity given by Eq. (26). The results of fitting Eq. (26) to the reaction rate ($a\{t\}$) of the lipase at each trial is utilized to determine k_d .

Reaction rate constants $a\{t\}$ for each trial and k_d were determined by Origin Pro SR1 (Northampton, MA).

In order to take into account the effect of deactivation of the enzyme in the rate expressions for the glycerolysis and depict the data in two dimensions plots, it is useful to make use of the pseudo reaction time concept Malcata et al. [25]. The pseudo reaction time represents a mathematical combination of the time elapsed since the start of the series of experiments and the real reaction time. The pseudo reaction time for a particular batch is defined as

$$t^* = \frac{\int_{t_1}^t a\{\hat{t}\} d\hat{t}}{a_0} \quad (27)$$

where t^* is the pseudo reaction time, \hat{t} is a dummy variable, t_1 is the time at which processing of the particular batch of interest was initiated, and t is the elapsed time since a particular batch of interest was initiated. Consequently, $(t-t_1)$ is the time during which a particular batch of oil is in contact with the lipase (the actual reaction time). In physical terms when the rate of deactivation of the enzyme is negligible, the pseudo reaction time t^* becomes equal to the actual reaction time ($t-t_1$). When the rate of deactivation is significant, the difference between the actual reaction time and the pseudo reaction time indicates how much longer the reaction mixture must remain in the reactor to achieve the conversion that would have been achieved if the enzyme had not been partially deactivated. In terms of Eqs. (26) and (27)

$$t^* = \frac{1}{k_d} \{ [\exp\{-k_d(t_1-t_0)\}] - [\exp\{-k_d(t-t_0)\}] \} \quad (28)$$

The pseudo reaction times were calculated according to Eq. (28) by using the values of k_d attained, the elapsed time since the start of the experiments, and the actual reaction time.

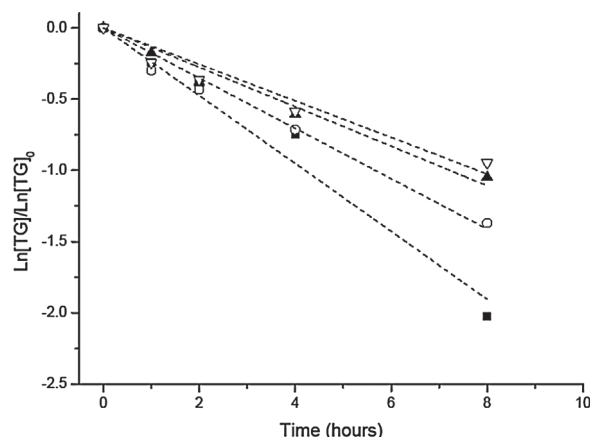


Fig. 2. Semilogarithmic plot of changes in TG concentration as a function of time for a first-order reaction used in determination of the reaction rate constant for the first set of five 48 h-trials. ■ trial 2, ○ trial 3, ▲ trial 4, ▽ trial 5.

3. Results and discussion

First, five trials of 48 h each, reutilizing the same batch of lipase were considered. Eqs. (19) and (20) were utilized to fit the experimental data and Eq. (28) was used to determine the pseudo reaction time.

Fig. 2 shows the different reaction rates for the same batch of lipase reutilized in 5 trials linearized in a semilogarithmic plot. Only the first 8 h of each trial were utilized to avoid data near of the reaction equilibrium that could interfere in an adequate linearization. The first trial was not depicted because this trial utilizes fresh biocatalyst that is first introduced into the biocatalyst basket and put into contact with the reaction mixture. We believe that in this first trial, the immobilized enzyme has to be first impregnated of the reaction mixture at the beginning of the glycerolysis reaction, and the reaction rate of this first trial can be affected by this impregnation time. For this reason we did not use the first trial for the lipase inactivation study.

The slope of each trial is shown in Table 1. The slope of each line represents the reaction rate constant of the lipase at each trial $a\{t\}$ and it can be utilized to characterize the loss of enzyme activity given by Eq. (26). The results of fitting Eq. (26) to the lipase reaction rate ($a\{t\}$) at each trial are shown in Fig. 3.

The value of a_0 and k_d obtained by fitting the reaction rates ($a\{t\}$) to Eq. (26) are shown in Table 2.

Moreover, introducing the k_d value attained into Eq. (26), it is possible to determine the half-life of the lipase (time necessary to reach 50% of the initial activity). If a_0 is 100% of activity, the mentioned half-life of the biocatalyst is approximately 145 h which means that, at these reaction conditions, 50% of the original lipase activity is lost after six reutilizations of 24 h each. This result indicates a deleterious effect of the glycerolysis reaction conditions on the biocatalyst activity. Unfortunately, it is not well understood the loss of catalyst activity following the reuse of enzymes in industrial operations. Enzyme activity can be influenced by the intrinsic characteristics of the lipase, i.e. thermostability and optimal water activity, and also by multiple external factors such as oil quality and process variables [28–30].

Table 1

Reaction rate constants determined from the slope of curves depicted in Fig. 2 for the first set of five 48 h-trials. SD = standard deviation ($n = 5$).

	Slope	SD	Residual Sum of Squares	Adj. R-Square
Trial 2	−0.23799	0.01358	0.06271	0.98393
Trial 3	−0.17647	0.00833	0.02357	0.98897
Trial 4	−0.13851	0.00746	0.01892	0.98567
Trial 5	−0.12818	0.01017	0.03519	0.96928

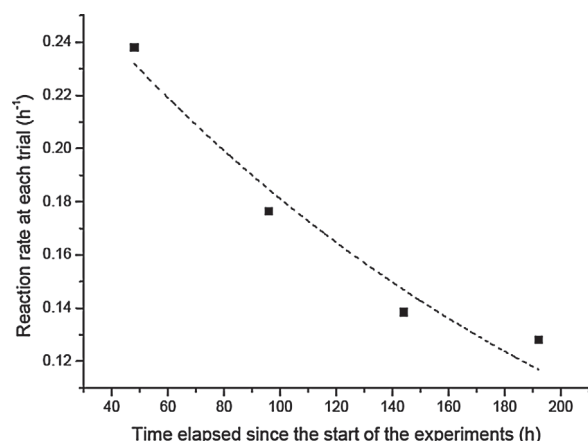


Fig. 3. Plot of the reaction rate of each trial versus time since the start of the experiments to determine k_d and a_0 .

Table 2

Value of a_0 and k_d determined for the first set of five 48 h-trials. SD = standard deviation ($n = 4$).

	Value	SD
$a_0(\text{h}^{-1})$	0.29142	0.02194
$k_d(\text{h}^{-1})$	0.00476	7.10E^{-4}

The pseudo reaction times were then calculated according to Eq. (28), by using the values of k_d attained, the elapsed time since the start of the experiments and the actual reaction time.

Finally, the results of the experimental data (symbols) and predicted by the model (dash lines) are shown in Fig. 4. As can be observed, [TG] is almost completely consumed and, on the contrary, only ca. 75% of [DAGE] is utilized in the course of the glycerolysis reaction. It should be also noted that [MG] predicted by the model fits well the experimental [MG]. This result indicates that the main reactions involved in the glycerolysis have been considered in the proposed kinetics mechanism, and that DG and MAGE did not undergo glycerolysis or do not contribute to the [MG] in a significant extent.

The kinetics parameters of the model are shown in Table 3. It can be

Table 3

Parameter estimates obtained from regression analysis of the data from the first set of 48 h-trials of ratfish liver oil glycerolysis. SD = standard deviation ($n = 25$).

Parameter	Parameter value ($\text{mM}^{-1} \text{h}^{-1}$)	SD
Θ_I	8.16E^{-3}	6.75E^{-14}
Θ_{II}	1.17E^{-2}	4.68E^{-10}
Θ_{III}	1.23E^{-2}	8.04E^{-10}
Θ_{IV}	4.48E^{-3}	4.84E^{-14}
Θ_V	1.44E^{-3}	9.38E^{-10}
Θ_{VI}	1.00E^{-2}	1.06E^{-7}

observed that the parameter corresponding to the forward reaction for TG (Θ_I) is 1.8 times bigger than that for DAGE (Θ_{IV}). This result confirms that immobilized lipase from *Candida antarctica* discriminates toward DAGE in glycerolysis reactions, even more taking into account that initial [DAGE] is almost four times higher than [TG].

A second experimental set of ten trials of 24 h each, reutilizing the same batch of lipase, was carried out. Similarly, Eqs. (19) and (20) were utilized to fit the experimental data and Eq. (28) was used to determine the pseudo reaction time.

Fig. 5 shows the different reaction rates for the same batch of lipase reutilized in 10 24 h-trials. For purposes of the regression analyses, only trials 2, 4, 6, 8, and 10 were utilized (Fig. 5). The first 8 h of trials 4, 6, 8 and 10 and the first 4 h of trial 2 were utilized to avoid data near of the reaction equilibrium that could interfere in an adequate linearization. Similarly to the first set of glycerolysis reactions, the first trial of this second experimental set with fresh lipase was not utilized for the lipase inactivation study, as it was previously explained.

The slope of each trial is shown in Table 4. The results of fitting Eq. (26) to the lipase reaction rate ($a\{t\}$) at each trial are shown in Fig. 6.

The value of a_0 and k_d obtained by fitting the reaction rates ($a\{t\}$) to Eq. (26) are shown in Table 5. Similar values of a_0 and k_d were attained for this second set of trials, which indicates a similar pattern of inactivation of the lipase. It should be noted that in this second set of glycerolysis reactions the same batch of lipase has catalyzed double number of glycerolysis reactions and, for this reason, it has been put into contact with double amount of glycerol, RLO and CPN in the same period of time. However, this bigger number of trials reutilizing the

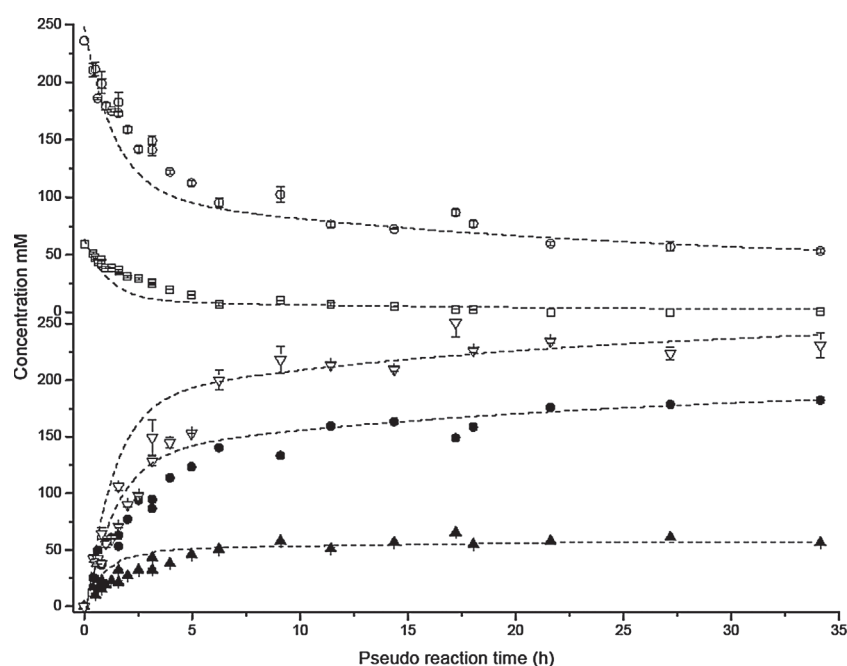


Fig. 4. Comparison of values predicted using the kinetics model with experimental data for the first set of 48 h-trials. □ TG experimental value, ○ DAGE experimental value, ▲ DG experimental value, ● MAGE experimental value, ▽ MG experimental value, predicted values.

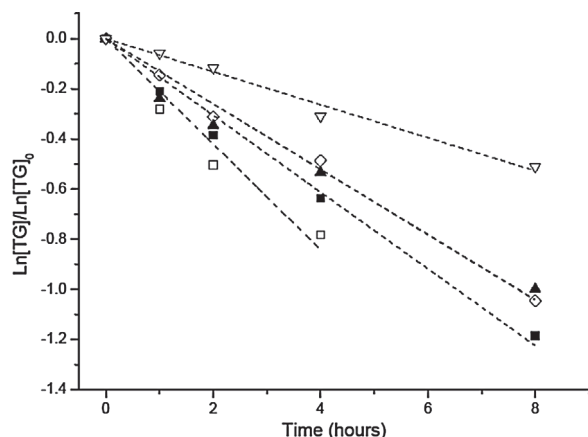


Fig. 5. Semilogarithmic plot of changes in [TG] as a function of time for a first-order reaction, used in determination of the reaction rate constant for the second set of ten 24 h-trials. □ trial 2, ■ trial 4, ◇ trial 6, ▲ trial 8, ▽ trial 10.

Table 4

Reaction rate constants determined from the slope of curves depicted in Fig. 5 for the second set of ten 24-trials. SD = standard deviation (n = 5).

	Slope	SD	Residual Sum of Squares	Adj. R-Square
Trial 2	−0.21053	0.01579	0.01572	0.97786
Trial 4	−0.15311	0.00583	0.01156	0.99279
Trial 6	−0.13045	0.00349	0.00414	0.99643
Trial 8	−0.13023	0.00789	0.02118	0.9819
Trial 10	−0.06592	0.00285	0.00277	0.99071

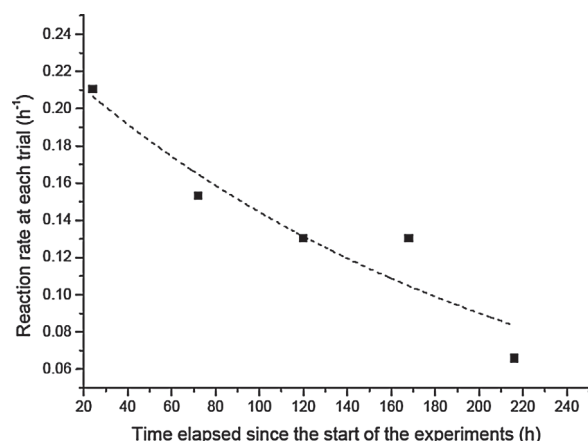


Fig. 6. Plot of the reaction rate of each trial versus time since the start of the experiments for the second set of ten 24 h-trials to determine k_d and a_0 .

Table 5

Value of a_0 and k_d determined for the second set of ten 24 h-trials. SD = standard deviation (n = 5).

	Value	SD
$a_0(\text{h}^{-1})$	0.23131	0.02292
$k_d(\text{h}^{-1})$	0.00472	9.93463E^{-4}

same batch of lipase does not seem to have an important influence on the lipase activity, which follows a similar inactivation pattern to that observed in the first set of 48 h-trials.

Similarly to the first experimental set, the value of k_d attained, was utilized to determine the pseudo reaction time according to Eq. (28).

The results of the experimental data (symbols) and predicted by the model (dash lines) for this second set of trials are shown in Fig. 7.

Similar parameter estimates were found in this second set of trials,

which indicates a similar behavior of the lipase in both trials (Table 6). In this case, θ_I was 1.6 times bigger than θ_{IV} which confirms the lipase discrimination against DAGE.

It has been previously reported that the loss of activity can be attributed to inactivation of the enzyme or to the negative impact of the accumulation of the reaction by-products and impurities in the reactor on mass transfer [31]. In order to evaluate the influence of the accumulation of reaction by-products and impurities in the reactor, a new set of experiments, consisting of five 24 h-trials reutilizing the same batch of lipase followed by a lipase washing procedure and, subsequent five 24 h-trials with the washed lipase, was carried out.

Similarly, Eqs. (19) and (20) were utilized to fit the experimental data and Eq. (28) was used to determine the pseudo reaction time. First, similarly to the previous sets of trials, semilogarithmic graphical depictions of the reaction rate in each trial were used to determine the reaction rate constant of the lipase in each reutilization. Then, k_d was determined based on the values of reaction rate constants. Unfortunately, much higher inactivation was observed in these five trials reutilizing the washed lipase. A k_d value of 0.01591 h^{-1} , more than 3 times higher than k_d values reached in the previous studied sets of glycerolysis, was attained. From this k_d value, the pseudo reaction time was calculated and utilized to depict the time course of the glycerolysis reaction. The results of the experimental data (symbols) and predicted by the model (dash lines) for TG and DAGE in this third set of five 24 h-trials after lipase washing are shown in Fig. 8.

The pseudo reaction times obtained indicate that the complete disappearance of TG could take place in approximately 1 h if the immobilized lipase were not inactivated. This unrealistic result from this last set of glycerolysis trials probably indicates that an inactivation mechanism more complex than a simple exponential decay may be involved. For this reason, at this level of inactivation, more complex models than a simple exponential decay should be utilized to properly determine enzyme activity and, consequently, pseudo reaction times. Moreover, the results also indicate that almost complete disappearance of TG is attained and 70% of DAGE is consumed, which points out good activity of the immobilized lipase in this set of trials. It has been also reported that the level of hydroperoxides is not the main influence in the decay rate of transesterification and that hydroperoxide decomposition products, namely secondary oxidation products, are the main responsible for lipase inactivation, which is not recovered even after washing with hexane [32]. Our results are in agreement with those previously reported for transesterification reactions in organic media. Accordingly, it could be pointed out that utilization of crude RLO should be carefully considered as one possible cause of lipase inactivation. It is highly recommended utilize highly refined oils in these glycerolysis reactions for optimum reutilization of the biocatalyst [33] or immobilized lipases more resistant to oxidation compounds [34].

Parameter estimates from this third set of trials were similar to those of first and second sets, indicating a similar behavior of the lipase (Table 7). In this case θ_I was 2 times bigger than θ_{IV} which strengthens the lipase discrimination against DAGE.

4. Conclusions

A kinetics modeling for lipase-catalyzed glycerolysis reactions has been developed. Although DAGE is almost four times more concentrated than TG in the reaction mixture, discrimination against DAGE has been numerically confirmed in the different experimental sets of glycerolysis reactions carried out. The rate of glycerolysis for TG was more than 1.5 times faster than that for DAGE in all trials studied. In addition, reutilization of the same batch of lipase in several trials of glycerolysis in a 1 L basket reactor has allowed us to evaluate the lipase inactivation in these glycerolysis reactions. Unfortunately much higher inactivation than expected was attained after 5 and 10 trials of 48 h and 24 h each, respectively. A half-life of 145 h was observed in both trials. Even lipase washing with a mixture of hexane/ethanol after five

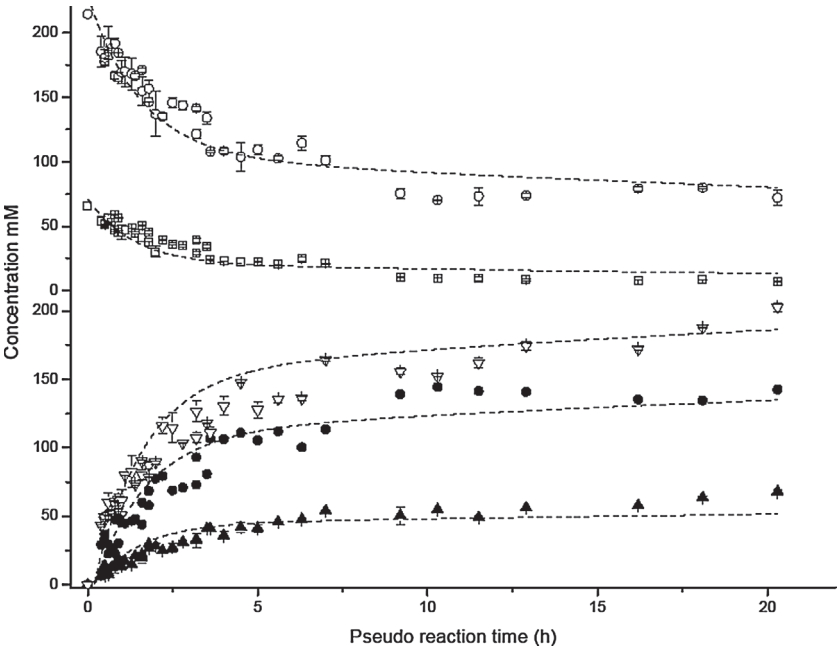


Table 6
Parameter estimates obtained from regression analysis of the data from the second set of trials of ratfish liver oil glycerolysis. SD = standard deviation (n = 40).

Parameter	Parameter value (mM ⁻¹ h ⁻¹)	SD
θ_I	$6.29E^{-03}$	$1.67E^{-06}$
θ_{II}	$1.46E^{-02}$	$7.43E^{-02}$
θ_{III}	$1.51E^{-02}$	$2.47E^{-03}$
θ_{IV}	$3.96E^{-03}$	$9.54E^{-07}$
θ_V	$1.30E^{-03}$	$4.24E^{-02}$
θ_{VI}	$1.63E^{-02}$	$5.92E^{-03}$

consecutive trials of 24 h was unsuccessfully attempted to fully recover lipase activity. For this reason, more studies are necessary to optimize enzyme reutilization in these glycerolysis reaction systems.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest in this work.

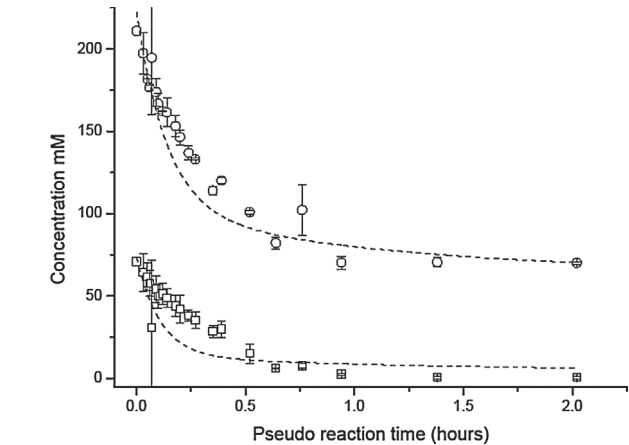


Fig. 8. Comparison of values predicted using the kinetics model with experimental data for the five 24 h-trials reutilizing a washed immobilized lipase. □ TG experimental value, ○ DAGE experimental value, predicted values.

Fig. 7. Comparison of values predicted using the kinetics model with experimental data for the second set of trials. □ TG experimental value, ○ DAGE experimental value, ▲ DG experimental value, ● MAGE experimental value, ▽ MG experimental value, predicted values.

Table 7
Parameter estimates obtained from regression analysis of the data from the third set of trials of ratfish liver oil glycerolysis. SD = standard deviation (n = 21).

Parameter	Parameter value (mM ⁻¹ h ⁻¹)	SD
θ_I	$7.89E^{-3}$	$1.97E^{-12}$
θ_{II}	$1.19E^{-2}$	$5.88E^{-8}$
θ_{III}	$1.11E^{-2}$	$6.57E^{-8}$
θ_{IV}	$3.70E^{-3}$	$7.84E^{-1}$
θ_V	$9.90E^{-3}$	$2.38E^{-6}$
θ_{VI}	$1.01E^{-2}$	$3.27E^{-7}$

Acknowledgements

This study has been funded by Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD, project number S2013/ABI-2728) and by Ministerio de Economía y Competitividad (project number AGL2016-76736-C3-1-R). Pablo Arranz-Martínez and Marta Corzo-Martínez also thank Ministerio de Economía y Competitividad and the European Social Fund: BES-2014-070395 for a pre-doctoral FPI grant and a Juan de la Cierva contract, respectively.

References

[1] C.D. Magnusson, G.G. Haraldsson, Ether lipids, *Chem. Phys. Lipids* 164 (5) (2011) 315–340.
[2] P.T. Pugliese, K. Jordan, H. Cederberg, J. Brohult, Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil, *J. Altern. Compl. Med.* 4 (1) (1998) 87–99.
[3] A. Parri, M. Fitó, C.F. Torres, D. Muñoz-Aguayo, H. Schröder, J.F. Cano, L. Vázquez, G. Reglero, M.-I. Covas, Alkylglycerols reduce serum complement and plasma vascular endothelial growth factor in obese individuals, *Inflammopharmacology* 24 (2) (2016) 127–131.
[4] R. Andreessen, Ether lipids in the therapy of cancer, *Prog. Biochem. Pharmacol.* 22 (1988) 118–131.
[5] W. Berdel, Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs, *Br. J. Cancer* 64 (2) (1991) 208.
[6] L. Diomedea, F. Colotta, B. Piovani, F. Re, E.J. Modest, M. Salmons, Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-RAC-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action, *Int. J. Cancer* 53 (1) (1993) 124–130.
[7] J. Palmblad, J. Samuelsson, J. Brohult, Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50 (4) (1990) 363–370.
[8] D. Martín, M. Morán-Valero, F. Señoráns, G. Reglero, C. Torres, In vitro intestinal bioaccessibility of alkylglycerols versus triacylglycerols as vehicles of butyric acid,

- Lipids 46 (3) (2011) 277–285.
- [9] C.F. Torres, L. Vázquez, F.J. Señoráns, G. Reglero, Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: a kinetic study, *Process Biochem.* 44 (9) (2009) 1025–1031.
 - [10] L. Vázquez, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero, C.F. Torres, Supercritical carbon dioxide fractionation of nonesterified alkoxyglycerols obtained from shark liver oil, *J. Agric. Food Chem.* 56 (3) (2008) 1078–1083.
 - [11] O. Fernandez, L. Vazquez, G. Reglero, C.F. Torres, Discrimination against diacylglycerol ethers in lipase-catalysed ethanolysis of shark liver oil, *Food Chem.* 136 (2) (2013) 464–471.
 - [12] Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids, *J. Biosci. Bioeng.* 91 (6) (2001) 529–538.
 - [13] A. Halldorsson, B. Kristinsson, G.G. Haraldsson, Lipase selectivity toward fatty acids commonly found in fish oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2) (2004) 79–87.
 - [14] Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Biosci. Bioeng.* 88 (6) (1999) 622–626.
 - [15] T. Ranjan Moharana, A.R. Byreddy, M. Puri, C. Barrow, N.M. Rao, Selective enrichment of omega-3 fatty acids in oils by phospholipase A1, *PLoS One* 11 (3) (2016) e0151370.
 - [16] C. Otero, J.A. Arcos, M.A. Berrendero, C. Torres, Emulsifiers from solid and liquid polyols: different strategies for obtaining optimum conversions and selectivities, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11 (4–6) (2001) 883–892.
 - [17] D. Remonatto, C.M.T. Santin, A. Valério, L. Lerin, L. Batistella, J.L. Ninow, J.V. de Oliveira, D. de Oliveira, Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean and canola oils in a free organic solvent system assisted by ultrasound, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176 (3) (2015) 850–862.
 - [18] K.G. Fiametti, M.K. Ustra, D. de Oliveira, M.L. Corazza, A. Furigo, J. Vladimir Oliveira, Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system, *Ultrason. Sonochem.* 19 (3) (2012) 440–451.
 - [19] N. Weber, K.D. Mukherjee, Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols, *J. Agric. Food Chem.* 52 (17) (2004) 5347–5353.
 - [20] R. Pawongrat, X. Xu, A. H-Kittikun, Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK, *Food Chem.* 104 (1) (2007) 251–258.
 - [21] A.C.V.B. Correia, M.M.R. Fonseca, M.S.L. Ferreira-Dias, Produção de emulsionantes através da glicerólise de óleo de bagaço de azeitona catalisada pela lipase da *Candida Rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano, *Millenium* (2011) 7–15.
 - [22] M.M.C. Feltes, P. Villeneuve, B. Baréa, N. Barouh, J.V. de Oliveira, D. de Oliveira, J.L. Ninow, Enzymatic production of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from fish oil in a solvent-free system, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89 (6) (2012) 1057–1065.
 - [23] M. Corzo-Martínez, L. Vázquez, P. Arranz-Martínez, N. Menéndez, G. Reglero, C.F. Torres, Production of a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis, *Food Bioprod. Process.* 100 (2016) 311–322.
 - [24] C.F. Torres, L. Vázquez, F.J. Señoráns, G. Reglero, Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector, *J. Chromatogr. A* 1078 (1–2) (2005) 28–34.
 - [25] F.X. Malcata, C.G. Hill, C.H. Amundson, Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: part III. Multiresponse kinetic studies, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (10) (1992) 1002–1012.
 - [26] L.P. Lessard, C.G. Hill, Effect of pH on the production of lipolyzed butter oil by a calf pregastric esterase immobilized in a hollow-fiber reactor: I. Uniresponse kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2) (2000) 183–195.
 - [27] C.F. Torres, M. Moeljadi, C.G. Hill, Lipase-catalyzed ethanolysis of fish oils: multi-response kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (3) (2003) 274–281.
 - [28] N.A. Ibrahim, S.T. i. Nielsen, V. Wigneswaran, H. Zhang, X. Xu, Online pre-purification for the continuous enzymatic interesterification of bulk fats containing omega-3 oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85 (1) (2008) 95–98.
 - [29] X. Tong, P.K. Busk, L. Lange, J. Pang, New insights into the molecular mechanism of methanol-induced inactivation of *Thermomyces lanuginosus* lipase: a molecular dynamics simulation study, *Mol. Simul.* 42 (5) (2016) 434–445.
 - [30] A. Canet, K. Bonet-Ragel, M.D. Benaiges, F. Valero, Lipase-catalysed transesterification: viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids, *Biomass Bioenergy* 85 (2016) 94–99.
 - [31] O.N. Ciftci, F. Temelli, Continuous biocatalytic conversion of the oil of corn distiller's dried grains with solubles to fatty acid methyl esters in supercritical carbon dioxide, *Biomass Bioenergy* 54 (2013) 140–146.
 - [32] Y. Wang, M.H. Gordon, Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase, *J. Agric. Food Chem.* 39 (9) (1991) 1693–1695.
 - [33] D. Pirozzi, Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (10) (2003) 608–613.
 - [34] K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente, Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: a very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide, *Process Biochem.* 46 (4) (2011) 873–878.

3.3. Influencia del procesado térmico en el comportamiento cristalino de un nuevo sistema de vehiculización lipídica compuesto por acil- y alquilglicéridos.

Pablo Arranz-Martínez, Carlos F. Torres, Luis Vázquez, Marta Corzo-Martínez, Fernanda Peyronel, Alejandro G. Marangoni. Influence of thermal processing on the phase behavior of a novel acylglyceride-alkylglyceride lipid-based delivery system. *Submitted to Food and Function*.

RESUMEN

Los vehículos lipídicos han sido utilizados de manera muy generalizada para la mejora de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de ciertos compuestos bioactivos. La capacidad de carga y la estabilidad del compuesto dentro de la matriz lipídica se ve influenciada por el comportamiento cristalino de los componentes lipídicos que constituyen el vehículo. En este estudio, se ha investigado la influencia del procesamiento térmico a 50 °C en el comportamiento cristalino de un sistema de vehiculización lipídica. Este nuevo sistema, compuesto por una mezcla de monoglicéridos, diglicéridos, alquilglicerol monoesterificado, y alquilglicerol diesterificado, se obtuvo a partir de la glicerólisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera*. Mediante calorimetría diferencial de barrido se observó que tanto el punto de cristalización como el de fusión del compuesto descendieron con la exposición a 50 °C durante tiempos superiores a 180 min. El análisis de la estabilidad polimórfica del compuesto mediante difracción de rayos X reveló que la transición de fase α a fase β ocurría de manera rápida para las muestras calentadas durante menos tiempo, mientras que aquellas expuestas durante 180 min permanecían en fase α durante 3 días. El estudio de microscopía de luz polarizada mostró cambios en la microestructura del material en función del tratamiento térmico.

Influence of thermal processing on the phase behavior of a novel acylglyceride-alkylglyceride lipid-based delivery system

Pablo Arranz-Martínez^a, Carlos F. Torres^a, Luis Vázquez^a, Marta Corzo-Martínez^a, Fernanda Peyronel^b, Alejandro G. Marangoni^{b*}

^aInstituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), C/ Nicolás Cabrera 9, Universidad Autónoma de Madrid 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain,

^bDept. of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada.

*Author to whom correspondence should be addressed:

Dr. A. G. Marangoni

Department of Food Science, University of Guelph,

50 Stone Road E, Guelph, ON N1G 2W1, Canada

e-mail: amarango@uoguelph.ca

Abstract

Lipid-based delivery systems have been broadly utilized to enhance bioavailability and bioaccessibility properties of drugs. Loading capacity and drug stability within the lipid matrix is influenced by the phase behavior of the lipid components that make up the vehicle. In this study we have investigated the influence of the thermal processing at 50 °C on the subsequent phase behavior of a lipid-based delivery system. This novel system is comprised of a blend of monoacylglycerols, diacylglycerols, monoalkylglycerols and dialkylglycerols, obtained upon enzymatic glycerolysis of ratfish liver oil. Differential scanning calorimetry revealed that crystallization and melting points decreased, while powder X-ray diffraction suggested changes in the crystal structure of the product when it was exposed to 50 °C for longer than 180 min. Samples heated for a short time, rapidly underwent a polymorphic transition from α phase to β crystals, whereas samples heated for long times remained in α phase for 3 days. Polarized light microscopy also showed changes in the microstructure of the material due to the thermal treatment.

Keywords: Alkylglycerol; Crystallization; Lipid delivery system; Monoacylglycerol; Polymorphism; Ratfish liver oil.

1. Introduction

The identification of new bioactive molecules with therapeutic properties has increased in the last few years. However, many of them have limited solubility in either water or oil, which may lead to drug precipitation in the gastrointestinal tract after oral uptake, a fact that reduces the bioaccessibility and bioavailability of the drug ¹. To overcome this limitation, the use of lipid-based delivery systems (LBDS) has gained much attention, with particular emphasis on self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) ². These formulations aim to maintain the drug in a dissolved and dispersed state before and during digestion, avoiding the slow dissolution process and precipitation which limits the bioavailability of hydrophobic drugs ^{3,4}.

The incorporation of the drug into the LBDS is usually carried out 5-10 °C above the crystallization temperature of the lipid mixture, so that the LBDS is in a molten state ⁵. Different techniques are employed to facilitate the solubilisation of the drug into the LBDS, such as high pressure homogenization, microwave-assisted microemulsification, high shear homogenization or ultrasound ⁶. Increasing the temperature of the mixture is a common resource to optimize the solubilisation of the drug into the LBDS ⁷. Although no specific time to achieve the complete dissolution of the drug into the LBDS is usually reported, authors usually homogenize or mix until a clear solution is obtained ⁸.

The efficiency of drug incorporation into a LBDS is generally specific to each case depending on the physicochemical compatibility of the drug/system ² and will be limited by the structure of the lipid matrix, the solubility of drug in the lipid melt and the polymorphic state of the lipid matrix ⁹. Shape and structure of the LBDS are critical aspects influencing the loading efficiency of the drug ¹⁰. The incorporation of the drugs

is assumed to occur between fatty acid chains, between lipid layers and also within crystal imperfections. Therefore, a highly ordered crystal lattice cannot accommodate large amounts of drug. If the lipid matrix is composed of similar molecules, the crystal formed will not contain many imperfections, whereas the presence of different lipids, such as mono-, di-, triglycerides, with different chain lengths and distributions, result in a more complex mixture. The solid formed from such heterogeneous mixture is able to incorporate foreign molecules more readily within its structure, resulting in a higher drug loading ¹¹.

Polymorphic transformations to more stable crystal forms are also a reason for drug expulsion from the crystal matrix. Under rapid cooling conditions, glycerides usually crystallise initially into a metastable form (α polymorph) ¹². However, during storage, α crystals may undergo polymorphic transitions to β' or β forms, with a concomitant rearrangement of the molecules. These changes in structure may be responsible for the expulsion of molecules encapsulated within ¹³, although storage at refrigeration temperature might help minimize this effect ¹⁴. The preservation of the α -phase during storage and transformation after administration (e.g. by temperature changes) could achieve a triggered and controlled release ¹⁵. On the other hand, if a polymorphic transition to the β form takes place during storage, the drug can then neither be protected from degradation nor released in a controlled way. However, if encapsulation were possible, rapid transition to the β polymorph might avoid issues related to unpredictable transitions ¹⁴.

We have previously designed a methodology to obtain a bioactive lipid carrier from ratfish liver oil (RLO) with potential self-emulsifying properties ¹⁶. This system consists of a mixture of acylglycerides and, in greater proportion, alkylglycerols, with

well-known biological properties¹⁷. To the best of our knowledge, no studies related to the phase behaviour of alkylglycerols-based delivery systems are reported in the literature. In this study, we have simulated the necessary conditions to solubilize a drug into the lipid mixture, i.e. a thermal treatment over the crystallization temperature (~45 °C) during a specific time, and investigated the effects of the pre-treatment on the phase behaviour of the system during storage. This information might be relevant to achieve higher drug loadings and predict shelf life of the LBDS.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Ratfish liver oil (RLO) was purchased from Phosphotech (Saint-Herblain Cedex, France). Menhaden oil and Cyclopentanone (CPN), categorized as food grade flavoring agent, was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glycerol was purchased from ICN Biomedicals (Aurora, OH). Novozym 435 (Nov435) (Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin contained 5000 Units/gram according to manufacturer) was kindly supplied by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark).

2.2 Glycerolysis reaction

The glycerolysis reaction was carried out at 40 °C in a 1-L stainless steel reactor coupled to a paddle stirrer at 200 rpm (Kiloclave, Buchi Glass Uster, Switzerland), according to the methodology previously described¹⁶. Briefly, 12 g of fresh immobilized Lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435) were introduced into a 100 µm mesh size basket and coupled to the stirrer. 128 g RLO, 12.8 g glycerol and 304

g CPN were added to the reactor to begin the glycerolysis reaction. The final product, named RLO glycerolysis product (RGP), was obtained after rotary evaporation of CPN at 40 °C and 1 mbar vacuum and stored under nitrogen atmosphere at 4 °C.

Chromatographic separation and quantitation of lipids present in the original sample of RLO and RGP was carried out by LC-ELSD, following the methodology explained in previous studies ¹⁶. Diacylglycerol ether (DAGE) and triacylglycerol (TAG) were identified by using commercial RLO and menhaden fish oil. And finally, products derived from glycerolysis of menhaden fish oil and purified by semi-preparative HPLC were used for identification of monoacylglycerol ether (MAGE), diacylglycerol (DAG) and monoacylglycerol (MAG). Quantitative analysis was performed by the external standard method, using calibration curves of each standard in the range 0.4–25 mg/mL. Relative standard deviation values were below 10% in all cases.

2.3 Thermal behaviour

A Mettler Toledo differential scanning calorimeter (DSC) (DSC 1, Mettler Toledo, Mississauga, ON, Canada) was used to determine the thermal behavior of the glycerides mixture. Samples, ranging from 10 to 12 mg were weighed and hermetically sealed into aluminum pans. A cooling and heating test was performed. In a preliminary test, samples were heated up to 100 °C at a heating rate of 5 °C/min, establishing that over 50 °C the product was completely melted. In further analysis, samples were held at 20 °C for 5 min and heated to 50 °C at 5 °C/min, then held for a specific time, followed by cooling to -30 °C at -5 °C/min and held at this temperature for 10 min. After that, samples were heated from -30 °C to 50 °C at 5 °C/min. Thermograms were registered,

and peak and onset temperatures were calculated using STARE software (Mettler Toledo).

2.4 Induction time of crystallization

A Phase Transition analyzer (PSA-70V-HT, Phase Technology, Richmond, BC, Canada) was utilized for monitoring nucleation events by optical scattering (turbidity). 150 μ L of melted samples were pipetted into the sample chamber, which was previously set at 50 °C. Samples were held for 10 min at 50°C and then cooled down at a controlled rate of 50 °C/min to the desired final temperatures, and held at this temperature for 30 min.

2.5 Polymorphism

Wide- and small-angle X-ray scattering patterns of the samples were obtained using a Multiflex powder X-ray diffractometer (XRD) (Rigaku MSC Inc. Toronto, ON, Canada). The X-ray source was a copper X-ray tube using the wavelength $\lambda = 1.5459 \text{ \AA}$, operating at 40 kV and 44 mA. The apparatus was set with a $1/2^\circ$ divergence slit, a $1/2^\circ$ scatter slit, and 0.3 mm receiving slit. Samples were prepared by filling the well of a metal slide with RGP and carefully leveled. All tests were carried out at 5 °C and investigated in the 2θ diffraction angle region ranging from 1 to 30° at an acquisition speed of $0.5^\circ/\text{min}$. MDI's Jade 6.5 software (Rigaku, Japan) was used to examine the WAXS spectra, where the presence of characteristic peaks was used to identify the presence different polymorphic forms.

2.6 Polarized light microscopy

The microstructures of SEDDS samples were examined using a Leica DMRXA2 microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a 20× objective lens. Polarized light micrographs were taken using a ORCA-Flash2.8 Digital CMOS camera C11440 (Hamamatsu, Hamamatsu, Shizuoka Pref., Japan). Approximately a 5 µL drop of molten samples was placed on a glass microscope slide, covered with a glass coverslip and cooled down to 5 °C. Slides were analyzed at 0 and 72 h at 5 °C. Between measurements, samples were stored at 5 °C.

3. Results and Discussion

Composition of RLO and RGP are shown in Table 1. DAGE content of RLO (80%, w/w) was much higher than TAG content (20%, w/w). As a result of the glycerolysis reaction of RLO, TAG completely disappeared whereas almost 25% of DAGE remained unreacted. This difference is due to the discrimination of the lipase against DAGE conversion¹⁸. At this point it should be pointed out that 2-MAGE and 1,3-DAG, formed mainly from 1,2-DAG by acyl migration, showed identical retention time in our HPLC method, thus, quantitation of these two compounds was made together. RGP obtained was composed of nearly 25% of MAG, responsible for the potential emulsification properties of the product.

3.1 Thermal behavior

Thermograms of RLO and RGP are shown in Figure 1. RLO is a liquid oil at room temperature, and so the crystallization process started from -8 °C. The complexity of the fatty acid profile and the presence of two glyceride derivatives, resulted in a broad signal, with a main peak at -60 °C. No peaks were registered below -70 °C, so an

“unfreezable” fraction could remain due to the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the oil ¹⁹. This compositional complexity is also reflected in the melting profile of RLO, where a broad signal from -70 °C to -10 °C was observed.

On the other hand, the RGP thermogram presented two main characteristics: 1) a first peak at 25 °C, corresponding to the crystallization of the newly synthesized MAG; 2) a second peak at -40 °C, occurring at higher temperature than that observed in pure RLO, a difference that may be due to the presence in RGP of crystalline MAG, that could act as seeding materials, and as catalytic impurities for the nucleation of oil portion ²⁰. Melting profile of RGP allowed to establish melting temperature of RGP at 45 °C.

As reported in the literature, oil obtained from marine sources contains a relatively high amount of PUFA ²¹, resulting in a low stability against oxidation. Although the PUFA content of RLO is lower than other fish oils (ca. 20% w/w) ¹⁶, RLO and its derivatives are susceptible to lipid oxidation. Therefore, in order to minimize oxidation effects, high temperatures were avoided when working with RGP, and thus 50 °C was selected as the melting temperature for further experiments.

Next, the influence of the duration of the exposure of RGP at 50 °C on the thermal behavior was evaluated (Fig. 2), in order to simulate shorter or longer dissolution/dispersion periods for the drug within the LBDS. A clear trend was observed in both melting and crystallization curves. When RGP was heated for less than 60 min, the crystallization peak of MAG was approximately 23 °C, whereas if heated for a longer time, that value decreased to 13 °C. Melting peaks displayed the same trend, decreasing from ~42 °C to 21 °C in the samples that were heated over 60 min. A first hypothesis was that crystal memory was not completely erased in such short period of

melting. For that reason, an additional experiment was performed. In this case, RGP was heated for 20 min at 50 °C, then cooled down up to -30 °C, and held for 10 min to allow for crystallization. Then the sample was heated again to 50 °C, where it was held for 20 min. This treatment was repeated a third time with the same sample. After the last melting, the crystallization peak was observed at 17 °C, similar to that obtained when the sample was heated continuously for 90 min.

As a consequence of this experiment, the crystal memory hypothesis was rejected, since during the same melting time, the crystallization temperature kept decreasing. Therefore, the exposure of RGP to 50 °C could have a cumulative effect on the structure of RGP that affected its thermal behavior.

According to the results obtained, 20 min and 180 min were chosen as critical times to observe changes in the thermal behavior, so further characterization was carried out with samples that were previously heated at 50 °C for 20 min (RGP20) and for 180 min (RGP180).

3.2 Induction time of crystallization

Induction time of crystallization was analyzed to corroborate the differences observed during DSC analyses. According to the DSC thermograms, the peak crystallization temperature of RGP20 was 25 °C, with an onset temperature of 28 °C, whereas for RGP180, these values were 15 °C and 20 °C, respectively. Five temperatures were chosen to carry out the experiments, namely 30, 27.5, 25, 22.5 and 20 °C.

Fig. 3 shows that RGP20 crystallized rapidly below 27.5 °C, while RGP180 required the temperature to drop to 22.5 °C to start a slower crystallization process. To

discard the crystal memory hypothesis, a similar experiment to the one carried out by DSC was performed. This time, the same RGP20 sample was heated at 50 °C for 10 min and cooled down to 25 °C, where it was held for 30 min. This process was repeated five times, observing that nucleation kinetics were gradually slower (Fig. 4). This results would confirm that the repeated exposure of RGP to temperatures over its melting point could have an effect on the crystallization behavior of the samples.

3.3 Polymorphism

X-ray diffractograms of RGP20 and RGP180 are shown in Fig. 5. At 0 h, right after cooling the samples to 5 °C directly from the molten state, WAXS diffraction patterns of both RGP20 and RGP180 exhibited a single peak at $d = 4.14 \text{ \AA}$, which corresponds to the formation of α phase. In spite of the low temperature set to carry out the experiments, apparently, transformation to sub- α phase did not occur. This may be due to molecular incompatibility caused by the heterogeneity of the MAG molecules²².

Aging of the samples resulted in changes in the WAXS diffraction patterns. RGP20 revealed a polymorphic transition to the β form, as evidenced by the appearance of a strong peak at $d = 4.57 \text{ \AA}$, and secondary peaks at $d = 4.30 \text{ \AA}$, $d = 4.11 \text{ \AA}$ and $d = 3.94 \text{ \AA}$ ²³. These peaks first appeared after 24 h, and no further changes were detected after longer storage. On the contrary, the α phase formed in RGP180 appeared to be more stable and no changes in the WAXS patterns were observed during 72 h storage.

Analysis of the SAXS patterns showed a broad peak, present in every sample, at approximately $d = 26 \text{ \AA}$. This is indicative of a certain degree of liquid ordering. Nevertheless, some differences were also observed between both samples. At 0 h, RGP20 exhibited a large peak at $d_{001} = 57 \text{ \AA}$ and a smaller peak at $d_{004} = 15.5 \text{ \AA}$,

corresponding to the α phase, according to the peak observed in WAXS at $d = 4.14 \text{ \AA}$ at this time. After 72 h of storage at 5°C , as a result of the polymorphic transition to β phase, peaks at lower d value, namely $d_{001} = 48 \text{ \AA}$, $d_{003} = 15.54 \text{ \AA}$ and $d_{004} = 12.26 \text{ \AA}$, were observed. However, in RGP180, peaks corresponding to $d_{001} = 62.50 \text{ \AA}$ and $d_{004} = 15.60 \text{ \AA}$ were detected, which remained stable during the analysis, and would confirm the more disordered state of the sample.

3.4 Polarized Light Microscopy

PL micrographs of RGP20 and RGP180 immediately after crystallization and after aging for 72 h are shown in Fig.6. Needle-like crystals were observed in both RGP20 and RGP180 at 0 h, with a cross-sectional length of roughly $10\text{-}15 \text{ }\mu\text{m}$. The number of formed crystals was lower in RGP180 than RGP20. These structures are similar to that observed by Da Pieve et al.²⁴ in cod liver oil containing MAG after crystallization without shearing.

Aging of RGP20 resulted in a greater amount of crystals following the same pattern than that observed at 0 h. However, after 72 h, RGP180 displayed a change in the morphology of the crystals, which rearranged to form a spherulite, with curved branches over $100 \text{ }\mu\text{m}$. The spherulites observed in this sample differ from other similar structures reported in the literature for mixtures of MAGs and TAGs²⁵.

4. Conclusions

The crystallization behavior of a lipid-based delivery system mixture composed of MAG, DAG, MAGE and DAGE, derived from an enzymatic glycerolysis of ratfish liver oil, was influenced by the thermal pre-treatment utilized to melt the product. A

short exposure to temperatures above the melting point of the product resulted in a crystallization process into an α phase at a higher temperature and with faster kinetics. The polymorphic transition to β crystals took place in less than 24 h of storage at 5 °C. On the other hand, heating at 50 °C over 180 min decreased the crystallization temperature, resulting in slower nucleation kinetics of the α phase. However, this phase remained stable over the storage time analyzed. Polarized light microscopy revealed different structures for both samples.

Further experiments with a bioactive compound dissolved or dispersed into the lipid-based delivery system should be carried out to verify the influence that both thermal pre-treatments may have on the drug loading capacity of the vehicle and drug stability within the lipid matrix.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Pablo Arranz-Martínez thanks Ministerio de Economía y Competitividad and the European Social Fund: BES-2014-070395 for a predoctoral grant.

REFERENCES

1. S. Kalepu, M. Manthina and V. Padavala, Oral lipid-based drug delivery systems—an overview, *Acta Pharm. Sin. B*, 2013, **3**, 361-372.
2. R. N. Gursoy and S. Benita, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs, *Biomed. Pharmacother.*, 2004, **58**, 173-182.
3. S. Gupta, R. Kesarla and A. Omri, Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems, *ISRN Pharm.*, 2013, **2013**, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/848043>.
4. J. Khan, T. Rades and B. J. Boyd, Lipid-Based Formulations Can Enable the Model Poorly Water-Soluble Weakly Basic Drug Cinnarizine To Precipitate in an Amorphous-Salt Form During In Vitro Digestion, *Mol. Pharmaceutics*, 2016, **13**, 3783-3793.
5. P. Yingchoncharoen, D. S. Kalinowski and D. R. Richardson, Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come, *Pharmacol. Rev.*, 2016, **68**, 701-787.
6. M. R. Shah, M. Imran and S. Ullah, in *Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*, William Andrew Publishing, Oxford, UK, 2017, Chapter 1 - Solid lipid nanoparticles, pp. 1-35.
7. T. R. Kommuru, B. Gurley, M. A. Khan and I. K. Reddy, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment, *Int. J. Pharm.*, 2001, **212**, 233-246.
8. R. Abbasalipurkabir, A. Salehzadeh and R. Abdullah, Delivering tamoxifen within solid lipid nanoparticles, *Pharm. Technol.*, 2011, **35**, 74-79.
9. R. H. Müller, K. Mäder and S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, **50**, 161-177.
10. C. C. Trujillo and A. J. Wright, Properties and stability of solid lipid particle dispersions based on canola stearin and Poloxamer 188, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2010, **87**, 715-730.
11. S. Wissing, O. Kayser and R. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2004, **56**, 1257-1272.
12. K. Sato, Crystallization behaviour of fats and lipids—a review, *Chem. Eng. Sci.*, 2001, **56**, 2255-2265.
13. D. Hou, C. Xie, K. Huang and C. Zhu, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs), *Biomaterials*, 2003, **24**, 1781-1785.
14. A. M. Nik, S. Langmaid and A. J. Wright, Nonionic surfactant and interfacial structure impact crystallinity and stability of β -carotene loaded lipid nanodispersions, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 4126-4135.
15. V. Jennings, A. Gysler, M. Schäfer-Korting and S. H. Gohla, Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, **49**, 211-218.
16. M. Corzo-Martínez, L. Vázquez, P. Arranz-Martínez, N. Menéndez, G. Reglero and C. F. Torres, Production of a bioactive lipid-based delivery system from

- ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis, *Food and Bioproducts Processing*, 2016, **100**, 311-322.
17. A.-L. Deniau, P. Mosset, F. Pédrone, R. Mitre, D. L. Bot and A. B. Legrand, Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 2175-2184.
18. P. Arranz-Martínez, M. Corzo-Martínez, L. Vázquez, G. Reglero and C. F. Torres, Lipase catalyzed glycerolysis of ratfish liver oil at stirred tank basket reactor: A kinetic approach, *Process Biochem.*, 2018, **64**, 38-45.
19. I. Tolstorebrov, T. Eikevik and M. Bantle, A DSC determination of phase transitions and liquid fraction in fish oils and mixtures of triacylglycerides, *Food Res. Int.*, 2014, **58**, 132-140.
20. A. Alfutimie, N. Al-Janabi, R. Curtis and G. J. Tiddy, The Effect of monoglycerides on the crystallisation of triglyceride, *Colloids Surf., A*, 2016, **494**, 170-179.
21. J. Whelan and C. Rust, Innovative dietary sources of n-3 fatty acids, *Annu. Rev. Nutr.*, 2006, **26**, 75-103.
22. S. Verstringe, K. Moens, N. De Clercq and K. Dewettinck, Crystallization behavior of monoacylglycerols in a hydrophobic and a hydrophilic solvent, *Food Res. Int.*, 2015, **67**, 25-34.
23. C. Chen and E. Terentjev, Aging and metastability of monoglycerides in hydrophobic solutions, *Langmuir*, 2009, **25**, 6717-6724.
24. S. Da Pieve, S. Calligaris, E. Co, M. C. Nicoli and A. G. Marangoni, Shear Nanostructuring of Monoglyceride Organogels, *Food Biophysics*, 2010, **5**, 211-217.
25. R. C. da Silva, F. A. S. D. M. Soares, J. M. Maruyama, N. R. Dagostinho, Y. A. Silva, J. N. R. Ract and L. A. Gioielli, Crystallisation of monoacylglycerols and triacylglycerols at different proportions: Kinetics and structure, *Int. J. Food Prop.*, 2017, **20**, S385-S398.

382 **Table 1.** Lipid composition of RLO and RGP (%*, w/w*). Values shown as mean \pm SD
 383 (n = 2)

	<i>TAG</i>	<i>DAGE</i>	<i>MAGE + 1,3-DAG</i>	<i>1,2-DAG</i>	<i>MAG</i>
<i>RLO</i>	80.5 \pm 0.4	19.5 \pm 0.3	—	—	—
<i>RGP</i>	—	23.9 \pm 0.3	41.9 \pm 5.1	9.6 \pm 2.0	24.6 \pm 2.4

384
 385

List of Figures

Figure 1. DSC thermal behavior of RLO (dashed line) and RGP (solid line) during crystallization and melting.

Figure 2. DSC crystallization (a) and melting (b) curves of RGP after melting at 50 °C during time ranging from 0 min to 1440 min.

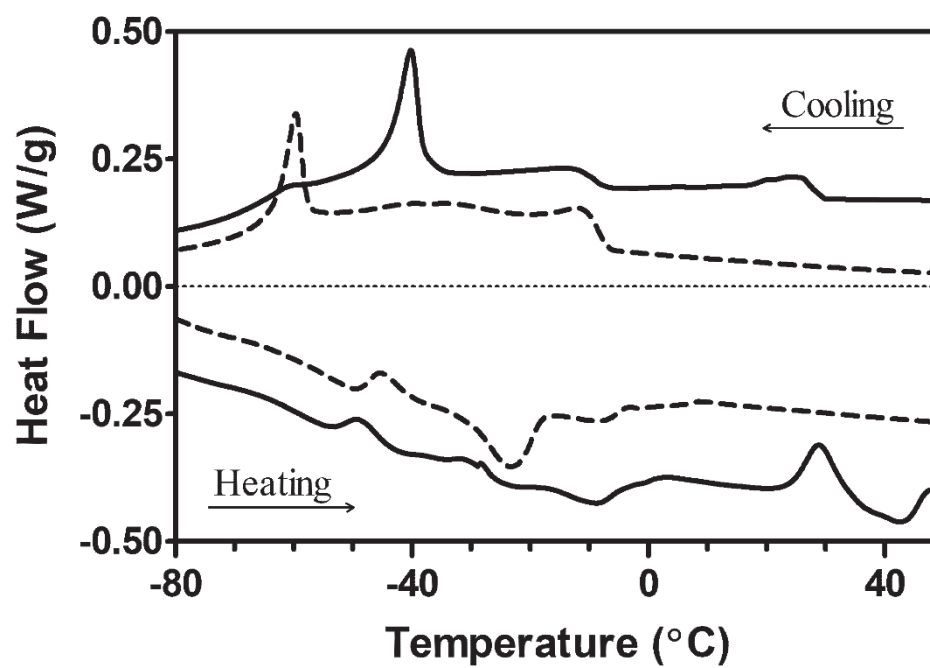
Figure 3. Nucleation kinetics of RGP20 (a) and RGP180 (b) at 20 °C (red line), 22.5 °C (green line), 25 °C (blue line), 27.5 °C (purple line) and 30 °C (black line) after melting at 50 °C.

Figure 4. Nucleation kinetics of RGP20 at 25 °C after melting at 50 °C for 10 min. Each curve corresponds to the number of successive heating-cooling cycles.

Figure 5. X-ray spectra in WAXS region of RGP20 (a) and RGP180 (b) and in SAXS region for RGP20 (c) and RGP180 (d), right after cooling down from melting at 50 °C (solid line) and after 72 h aging at 4 °C (dashed line).

Figure 6. Polarized light microscopy images at 4 °C, right after cooling down from melting at 50 °C of RGP20 (a) and RGP180 (b) and after 72 h aging at 4 °C of RGP20 (c) and RGP180 (d). Scale bars represent 55 µm.

410 Fig. 1

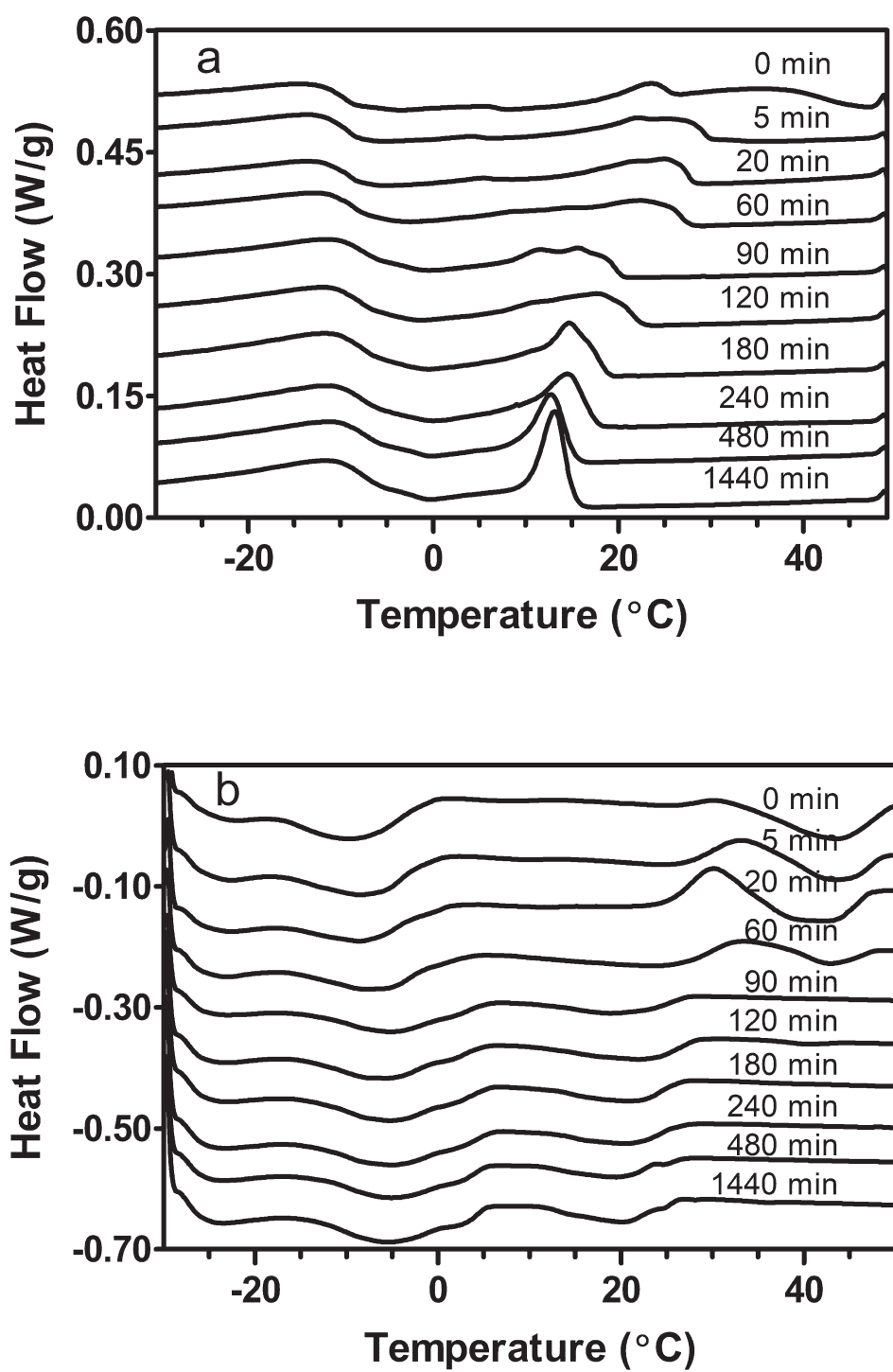


411

412

413

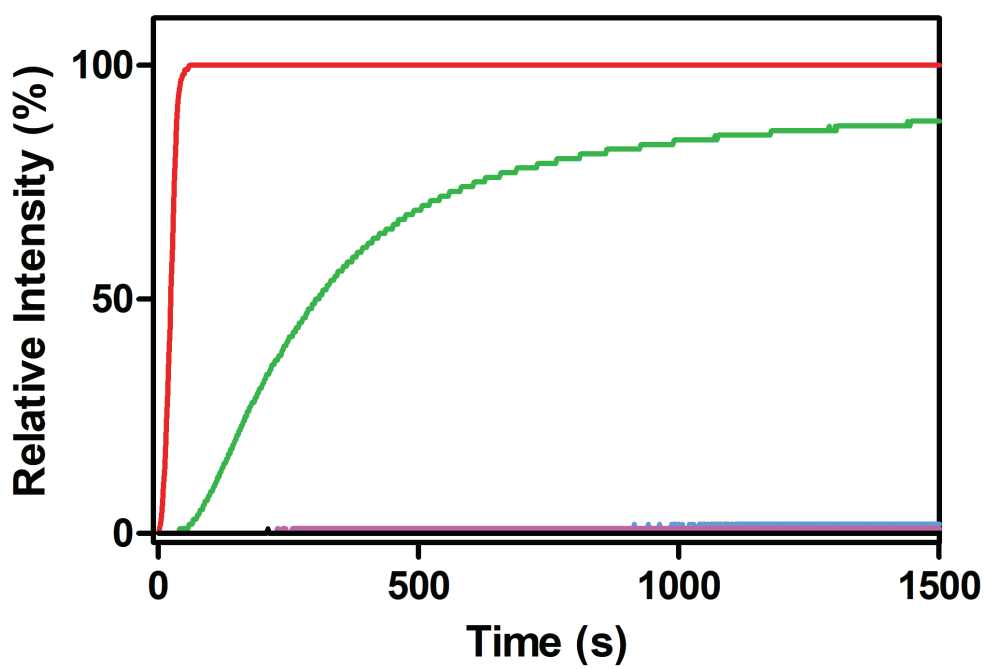
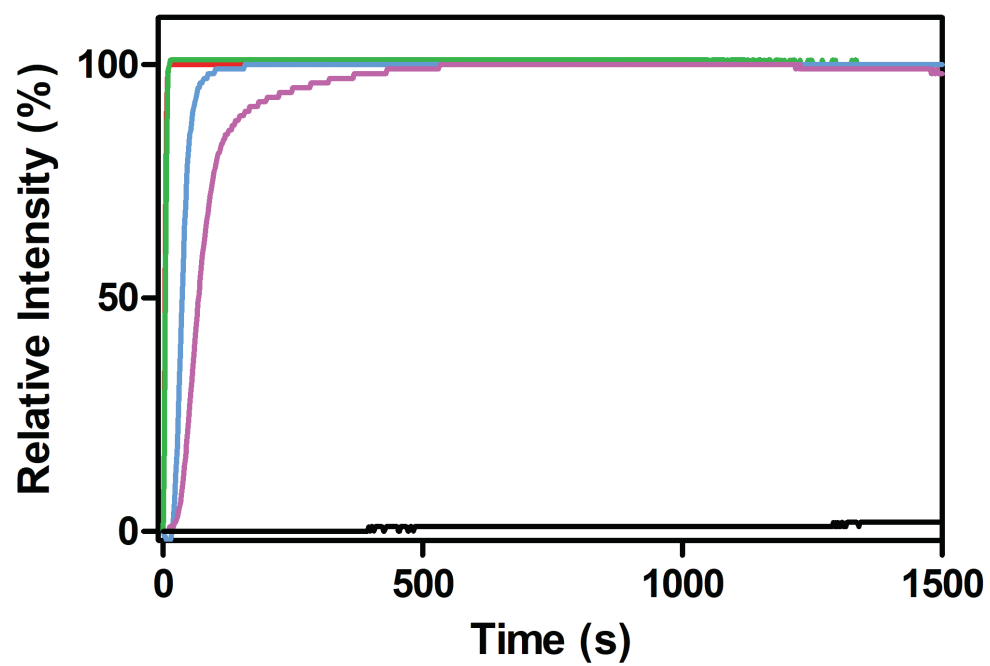
414 **Fig. 2**



415

416

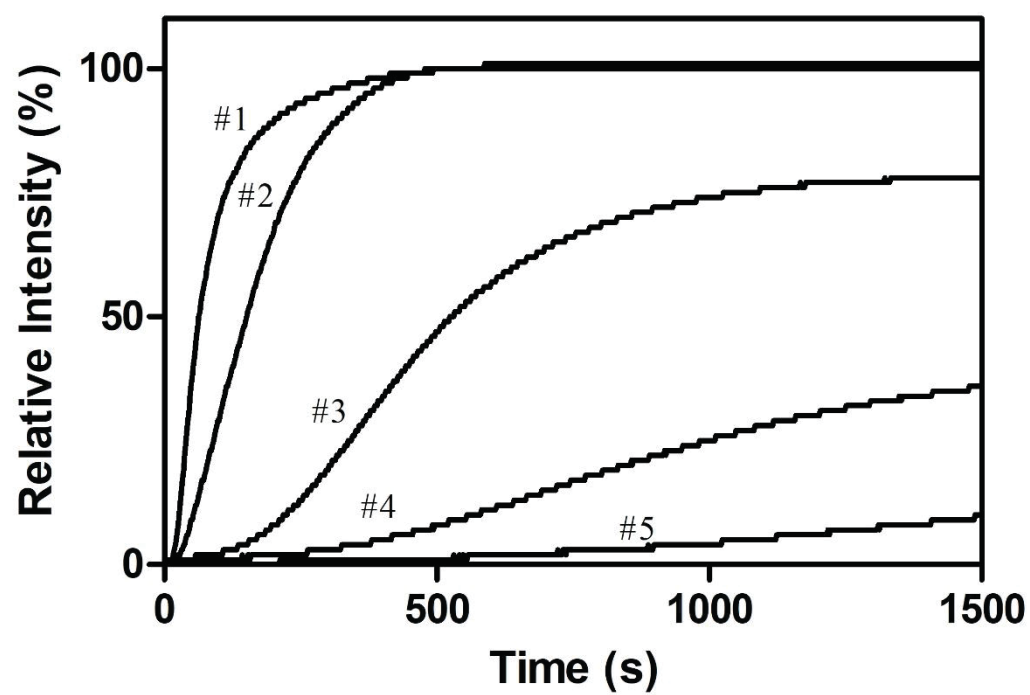
417 Fig. 3



418

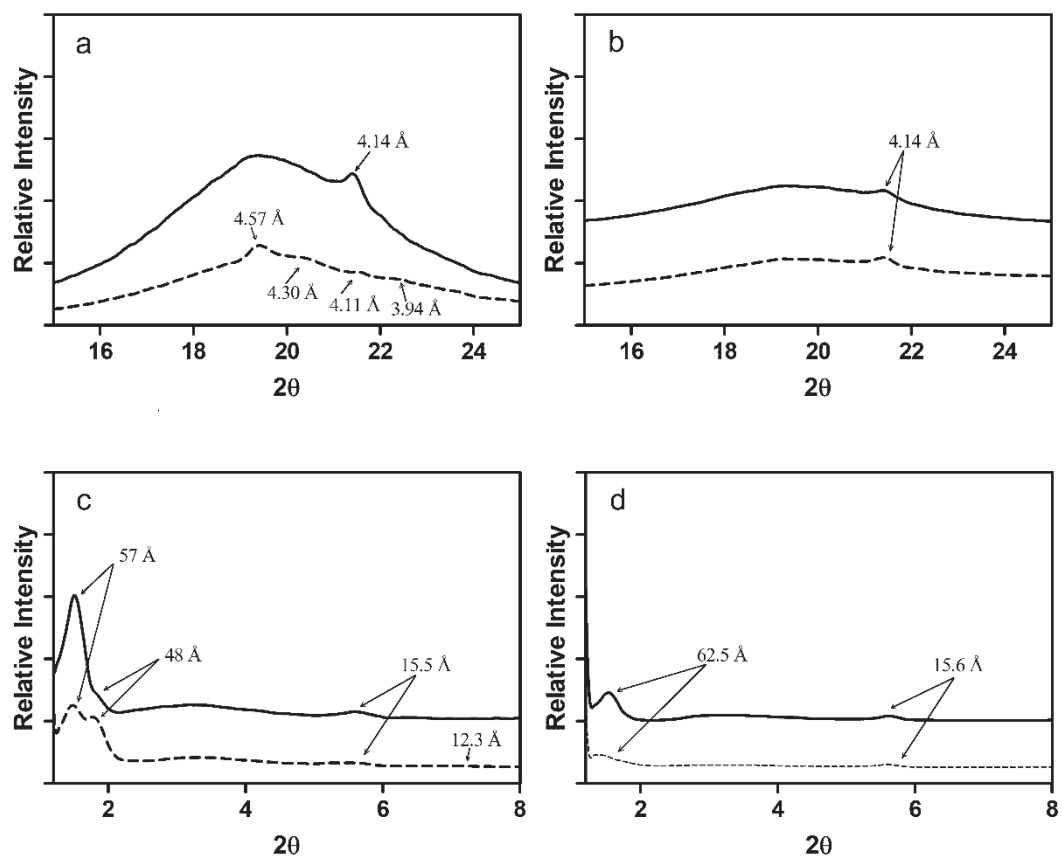
419

420 Fig. 4



421

422

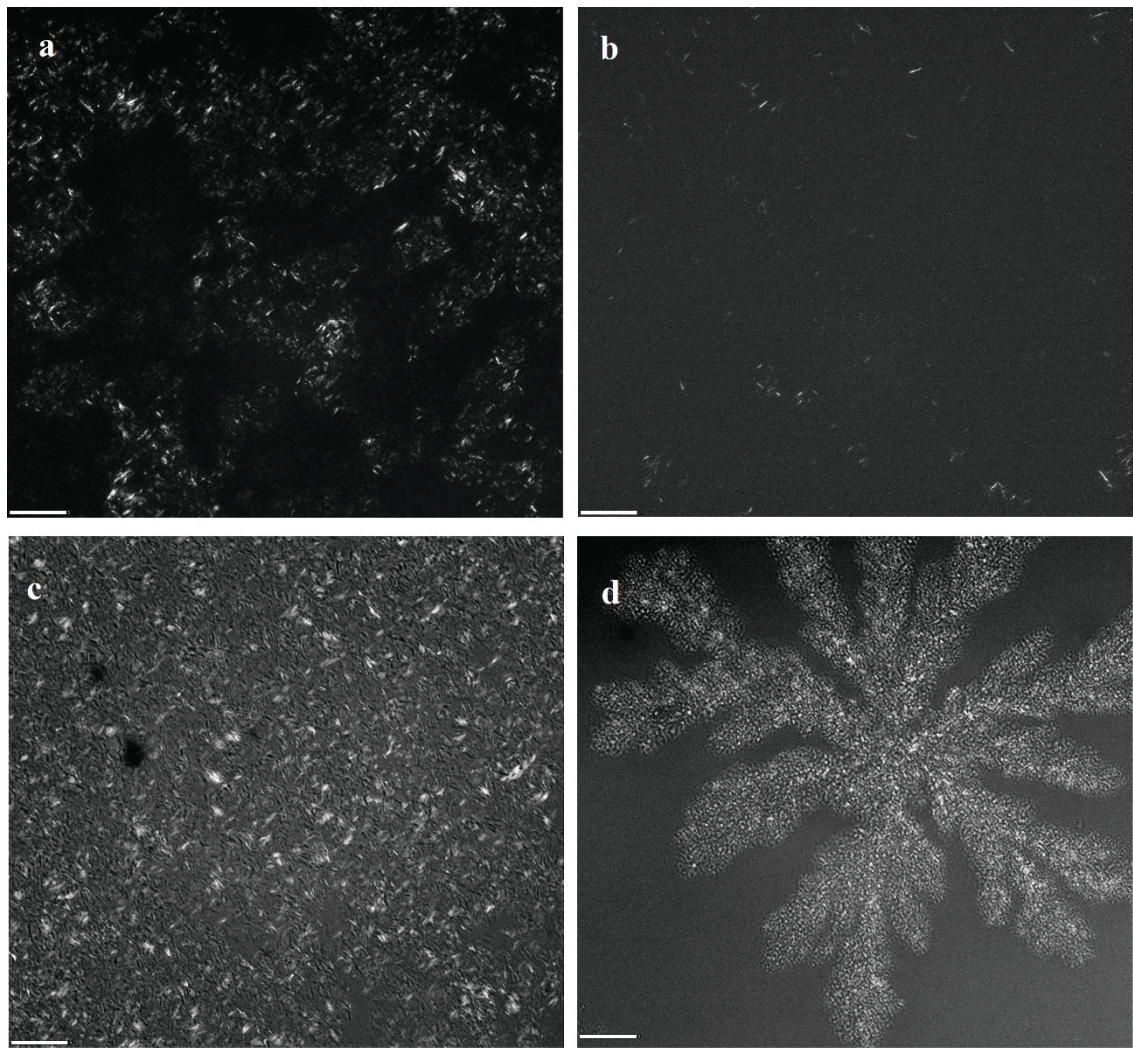


424

425

426

Fig. 6



3.4. Producción de un nuevo éter fosfolipídico mediante transfosfatidilación sólido-sólido en presencia de fosfolipasa D de grado alimentario.

Pablo Arranz-Martínez, Víctor Casado, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. Novel glyceryl ethers phospholipids produced by solid to solid transphosphatidylation in the presence of a food grade phospholipase D. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2017**, 119, 1600427. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201600427>.

RESUMEN

Se ha investigado la transfosfatidilación enzimática entre batil alcohol y fosfatidilcolina. Con el fin de aumentar la aplicabilidad del proceso, se estudió el uso de metodología de eliminación de producto *in situ* y el empleo de un medio bifásico comprendido de un tampón acuoso y una fase orgánica consistente en un disolvente categorizado como seguro. Se estudiaron diferentes fases orgánicas (limoneno, pineno, etil-isovalerato, etil-lactato, etil-butirato, hexanal y ciclopentanona), y una fase acuosa (tampón acetato 0.1 M y pH = 5.5). También se investigó la relación entre las fases orgánicas y acuosa, así como distintas relaciones molares entre alquilglicerol:fosfatidilcolina (10:1, 5:1, 2:1, 1:1 y 1:2). Se ajustó la adición de cloruro cálcico y la temperatura de reacción. Por último, se optimizó la carga enzimática y la concentración molar de los sustratos. Asimismo, se comparó la tasa de hidrólisis con respecto a la reacción de transfosfatidilación. Los mejores resultados (obtención de 70% p/p del éter fosfolipídico) se consiguieron con el uso de 5% (p/p) de fosfolipasa D, relación equimolar entre los reactivos, y una relación volumétrica 1:3 limoneno:acetato. La productividad volumétrica del proceso se optimizó hasta 126 mM, y se escaló el proceso hasta una mezcla de reacción de 50 g, consiguiendo resultados similares. Este estudio revela un proceso para la producción de fosfolípidos personalizados a partir de fuentes comerciales con alta productividad volumétrica. El producto obtenido, de alto valor añadido, está destinado a su uso como sistema de vehiculización y como lípido bioactivo.

Research Article

Novel glyceryl ethers phospholipids produced by solid to solid transphosphatidylation in the presence of a food grade phospholipase D

Pablo Arranz-Martínez¹, Víctor Casado^{1,2}, Guillermo Reglero^{1,3} and Carlos F. Torres¹

¹ Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

² Department of Chemical and Bioprocess Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

³ IMDEA-Food Institute, CEI (UAM-CSIC), Madrid, Spain

Enzymatic transphosphatidylation between batyl alcohol and phosphatidylcholine has been investigated. In situ product removal methodology and the utilization of a green biphasic medium consisting of a buffer and an organic phase comprised of generally recognized as safe flavoring additives, have been established as milestones to increase the applicability of the process. Different organic phases (limonene, pinene, ethyl isovalerate, ethyl lactate, ethyl butyrate, hexanal, and cyclopentanone) and one aqueous phase (0.1 M acetate buffer at pH = 5.5) were studied. The relative proportion of organic and aqueous phases was also investigated. Different molar ratios alkylglycerol/phosphatidylcholine (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, and 1:2) were also evaluated. Addition of calcium chloride and the reaction temperature have been adjusted in the enzymatic transphosphatidylation. Finally, the percentage of phospholipase D and the molar concentration of the reactants were also optimized. The ratio transphosphatidylation to hydrolysis was evaluated for the different biphasic reaction mixtures tested. The best results (ca. 70% w/w of glyceryl ether phospholipid) were achieved utilizing 5% (w/w) of phospholipase D, equimolar ratio of reactants and limonene/acetate buffer at a volumetric ratio 1:3. The volumetric productivity of the process was then optimized up to 126 mM and scaled-up to 50 g of reaction mixture with similar results in terms of composition and yield. This study reports a procedure for the production of tailor-made phospholipids from commercial sources with high volumetric yield. These highly valuable ingredients are intended to be used as both delivery systems and bioactive lipids.

Practical applications: Solid to solid transphosphatidylation based on in situ product removal has been developed for the synthesis of a novel glyceryl ether phospholipid, incorporating batyl alcohol into the polar head of the phosphatidylcholine in the presence of a food grade PLD. Enzymatic transphosphatidylation usually reported in the literature utilize very low concentration of phospholipid and a large excess of the other reactant. In this sense, the present study evaluated different molar ratios alkylglycerol/phosphatidylcholine. Besides, regarding novel phospholipid as food for human use, the utilization of toxic organic solvents was avoided in its production, replacing them by GRAS organic solvents. Hence, this procedure readily scalable is intended to be used for obtaining this novel glyceryl ether phospholipid with capabilities to perform as both novel delivery systems and bioactive lipids. In addition, a very simple downstream process for product recovery has been also described.

Keywords: alkylglycerol / GRAS medium / phospholipase D / solid to solid / transphosphatidylation

Received: October 19, 2016 / Revised: February 21, 2017 / Accepted: February 23, 2017

DOI: 10.1002/ejlt.201600427

Correspondence: Dr. Carlos F. Torres, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), C/ Nicolás Cabrera 9, Universidad Autónoma de Madrid 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain
E-mail: carlos.torres@uam.es
Fax: +34-910017905

Abbreviations: PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PBA, phosphatidyl batyl alcohol; PLD, phospholipase D; PL, phospholipid

1 Introduction

Beyond their importance as constituents of cellular membranes, phospholipids (PL) have received increasing attention because of their emulsifying properties, capability to form supramolecular structures, utilization as drug delivery

systems, and for the development of biological membrane model systems [1].

The chemical synthesis of new PL is not trivial and enzymatic alternatives have received more and more importance. One of the most established methods is the enzymatic transphosphatidylation which consists of introducing new head groups into the polar head of glycerophospholipids catalyzed by a phospholipase D (PLD) [2].

Enzymatic transphosphatidylations usually reported in the literature, utilize very low concentration of PL and a large excess of the other reactant [3, 4]. In general, these processes are performed in a biphasic stirred emulsion systems, comprised of an aqueous buffer and an organic solvent. The aqueous phase favors the PLD activity that it is also activated at the formed interface. In most of the reported transphosphatidylation reactions, diffusional limitation has been attributed to the heterogeneity of the reaction system [5]. The use of “in situ product removal” [6] technology basically consists of a reaction mixture in which both reactants and products are above their solubility limit in the reaction mixture which improves both downstreaming operations and volumetric productivity [7]. Organic solvents commonly used in these reactions can be hazardous to human health and environment, hence, the use of substances commonly utilized as flavoring agents and with GRAS [8] category is considered as a healthier and safer alternative, as well as a promising strategy to increase the industrial feasibility for these bioprocesses [7, 9, 10].

Ether lipids, comprising a great variety of lipid compounds containing an ether linkage in their chemical structure, have been the subject of much attention because of their special technological and physiological functions [11, 12]. Archaeal ether lipids have found a variety of applications, including serving as antigen-carrying liposomes due to their adjuvant properties [13, 14]. Other popular ether glycerophospholipid with important biological activities is the platelet-activating factor (PAF), a 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine [15].

In the last years, bioactive molecules claiming a potential use as functional ingredients or nutraceuticals have been appearing in the scientific literature. However, many of them have limited hydro- and liposolubility, which makes difficult their inclusion in foods, and reduces its functionality [16]. Taking this into account, diverse strategies have been developed for drug delivery system, including the lipid-based vehicles, to enhance their bioavailability and bioaccessibility [17]. As mentioned before, both PL and ether lipids have shown remarkable properties as vehicles for drug transportation. Martin et al. [18] observed that during in vitro digestion of a synthetic phosphatidyl derivate of hydroxytyrosol, the hydrolysis products were found at the micellar phase fraction, indicating adequate bioaccessibility. Likewise, Yamamoto et al. [19] synthesized phosphatidylated monoterpenes that showed a markedly antiproliferative

effect on human cancer cells, while the free monoterpene alcohols had no effect.

Additionally, another delivery system for the entrapment and controlled release of drugs or nutraceuticals are liposomes. Several studies have shown that liposomes can be used to encapsulate vitamins, antioxidants, proteins, peptides, antimicrobials, essential oils, flavors, enzymes, minerals, and fatty acids [20]. Gastro-resistance of these liposomes should be also considered as a key factor in the formulation of bioactive molecules [21]. On this subject, major limitation of the utilization of conventional phospholipid bilayer products (conventional liposomes) is instability [22]. Alternatively, archaeosomes constitute a novel family of liposomes that demonstrate higher stability to several conditions in comparison with conventional lipids [23, 24].

Recently a new approach, defined as lipid replacement therapy (LRT), claims the utilization of membrane lipids, mainly phospholipids, to modulate and regulate numerous membrane functions [25]. In this sense, the development of novel phospholipids can acquire a new dimension with enormous potential. Recent trends in phospholipid research on synthetic phospholipids and their vesicular constructs could provide “smart” ways to release cargo from liposomes. In addition chemical and physical release triggers such as temperature changes, enzyme degradation, changes in pH, redox reactions, photochemical reactions, as well as the effects of shear stress on vesicles will have an impact as future delivery tools in biology and medicine [26]. For all these reasons, this study describes the production of a novel glyceryl ether phospholipid incorporating batyl alcohol into the polar head of the phosphatidylcholine in the presence of a food grade PLD. The molar ratio of the reactants and the utilization of GRAS flavoring agents as organic phase for the transphosphatidylation reaction, have been investigated. Finally, equimolar reactant and in situ product removal strategies have been utilized to maximize the productivity and yield of this procedure. Hence, this procedure readily scalable is intended to be used for obtaining this novel glyceryl ether phospholipid with capabilities to perform as both novel delivery systems and bioactive lipids. In addition, a very simple downstream process for product recovery has been also described.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Hydrogenated phosphatidylcholine, 90% (PC 90H), was purchased from Lipoid (Cham, Switzerland). Powdered preparation of *Actinomadura* sp. phospholipase D (EC 3.1.4.4) was acquired from Meito Sangyo CO (Nikko-Cho, Fuchu, Tokyo, Japan). According to the vendor specifications PLD contained 1500 U/mg (1 PLD Unit is

defined as the amount of enzyme producing 1 μmol per minute of choline from soybean lecithin when the enzyme solution is reacted at pH 5.5 at 37°C). Batyl alcohol from Nikko Chemicals was acquired to Jan Dekker Spain. Chloroform, 2-propanol, hexane, and methanol (HPLC grade) were purchased from Lab-Scan (Gliwice, Poland). Phosphoric acid (85%) was obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Formic acid (98%) and anhydrous calcium chloride (QP grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Cyclopentanone (99%), ethyl lactate (98%), hexanal (97%), (–)- β -pinene (97%), S-(–)-limonene (95%), ethyl isovalerate (98%), ethyl butyrate (99.5%), (all of them categorized as food grade), and ammonium hydroxide (28–30%) were acquired from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2 Phosphatidylcholine transphosphatidylation

Different quantities of PC and batyl alcohol were added to a biphasic mixture of 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.5) and organic GRAS phase in a 60-mL flask. The total volume of the reaction mixtures was 4.8 mL. When the mixture reached the desired temperature, a determined amount of PLD was added to the mixture. The flasks were placed in a temperature-controlled orbital shaker (IKA KS 4000 ic, Staufen, Germany) at 200 rpm.

The reaction was stopped after different time intervals and extracted with an appropriate volume of chloroform/methanol/water/phosphoric acid (18/9/4.5/4.5, v/v/v/v) for analytical purposes. Centrifugation (10 000 rpm for 5 min) in 50 mL centrifuge tubes separated the mixture into two phases, an upper aqueous phase and a lower phase. The lower phase was recovered to a 25 mL volumetric flask and analyzed by HPLC.

In order to determine the experimental and analytical error, three replicates of the mentioned extraction procedure were carried out in absence of PLD to avoid transphosphatidylation reaction. Thus, different concentrations of PC, batyl alcohol, and phosphatidic acid (PA) were analyzed by HPLC, showing a standard deviation of 4% for batyl alcohol and 8% for both PC and PA.

2.3 Phosphatidylcholine hydrolysis

In addition, production of PA was developed. Briefly, 21 mmol/L of PC were added to a mixture of ethyl butyrate and acetate buffer (2/1, v/v) in a 250 mL round bottom flask. The final volume of the mixture was 21 mL. A total of 35 mg of PLD were then added to the mixture. The reaction mixture was incubated for 20 h at 40°C and 200 rpm. After this time, the reaction mixture was centrifuged in a 50 mL centrifuge tubes at 10,000 rpm for 5 min, obtaining a solid phase and two liquid phases that were removed. Solid phase was then washed twice with 14 mL of ethyl butyrate and 7 mL of distilled water. The solid residue attained after removing

the liquid phases was finally freeze-dried, to obtain PA as a solid powder.

2.2 HPLC analyses

Ten microliters of the final transparent solutions from the 25 mL volumetric flask previously prepared, were analyzed on a Luna 5 μm HILIC diol column (250 mm, 4.60 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) coupled to an Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1200 Series HPLC containing a temperature-controlled column compartment, quaternary pump, autosampler, vacuum degasser, and a dual detection system comprised of an evaporative light scattering (ELSD) and a diode array detector.

The flow rate was 1.5 mL/min. A splitter valve was used after the column oven and only 40% of the mobile phase was directed through the ELSD detector (3.5 bar and 41°C). The column temperature was maintained at 55°C. The mobile phase for the analysis of the product mixture consisted of a ternary gradient of (A) hexane; (B) hexane/2-propanol (815/170 v/v); (C) 2-propanol/water/formic acid/ammonium hydroxide (840/140/9.8/0.5 v/v/v/v). The method starts at 50% of A and 50% of B for 5 min, increasing up to 100% of B in 5.1 min and maintained to 7 min. Then, up to 30.6% of C is added from 7 to 25 min. This composition is maintained to 30 min. Then 100% of B is restored at 35 min and initial conditions at 40 min. These initial conditions are maintained for 10 min.

Identification and quantification were carried out using standards of PC, batyl alcohol, and PA produced according to Section 2.3. Lack of commercially pure phosphatidylbatyl alcohol precluded its direct quantification. Therefore, indirect quantification was determined from the molar conversion of batyl alcohol, PC, and molar concentration of PA in the transphosphatidylation reaction. In order to minimize quantification errors when using HPLC with ELSD, rigorous calibration curves for each lipid class were developed for each set of samples injected, since the detector response was nonlinear and specific to each compound.

2.5 Transphosphatidylation reaction at gram scale

Finally, the process was also scaled-up to 48 mL of reaction mixture. The concentration of both substrates was 126 mmol/L and the ratio of organic phase/sodium acetate buffer phase was 1/3. The reaction mixture was incubated at 50°C for 48 h. Then, the reaction mixture was introduced in 50 mL centrifuge tubes and centrifuged at 10 000 rpm for 5 min. After centrifuging, two liquid phases and a solid interface were obtained from the product mixture. The solid interface was then washed twice with 24 mL of the organic solvent and three times with 36 mL of distilled water and centrifuged again. The solid phase attained after removing the organic solvent and water was then freeze-dried, to obtain a solid residue.

During the washing steps, remaining non-reacted PC and batyl alcohol were partially removed. Consequently, quantification of PBA in the HPLC analysis was determined utilizing the following formula:

$$\%PBA = 100 - [(W_{PC} + W_{PA} + W_{Batyl\ alcohol})/W_{r.m.}] \times 100$$

where W_{PC} , W_{PA} , $W_{Batyl\ alcohol}$ and $W_{r.m.}$ are the weight of each compound of the reaction mixture and the total weight of the reaction mixture, respectively.

2.6 Determination of substrates solubility

One milliliter of supersaturated solutions in each solvent of PC and batyl alcohol were prepared in 4-mL flasks and mixed by swirling for 1 h at 40°C. After that, 200 µL of the solutions were taken and the solvents were completely evaporated in rotatory evaporator. The residues were utilized to calculate the concentration of PC and Batyl alcohol soluble in every solvent.

3 Results and discussion

3.1 A comparative study of transphosphatidyl reaction in different GRAS solvents

Recent trends in enzymatic catalysis are heading toward the replacement of commonly utilized organic solvents by other less harmful and environmentally friendly GRAS solvents [26]. In this study, several GRAS solvents were proposed according to their polarity expressed as *Log P*. A first screening showed that ethyl lactate (0.20 *Log P*) was not adequate for transphosphatidyl reactions as a result of its miscibility with the aqueous buffer phase utilized. This result could be explained considering that phospholipase D (PLD) is activated at the interface with micelle-forming substrates [27]. Then, reactions were carried out using organic phases immiscible with water such as cyclopentanone (0.45 *Log P*) or hexanal (2.37 *Log P*) but they showed no PLD activity. Even more hydrophobic solvents such as (–)-β-pinene (4.16 *Log P*) was also tested. Unfortunately, the presence in this solvent of traces of monoterpenoid alcohols such as geraniol, susceptible to participate as an alcohol in the transphosphatidyl reaction replacing the polar head of phospholipids, resulted in the formation of an undesired transphosphatidyl byproducts, and for this reason, it was discarded. Finally, ethyl butyrate (1.77 *Log P*), ethyl isovalerate (2.12 *Log P*), and limonene (4.45 *Log P*), also immiscible with water, showed positive results in the transphosphatidyl reaction and were selected for further experiments.

3.1.1 Ratio of substrates

Different ratios of batyl alcohol and phosphatidylcholine (PC) were studied. For this purpose, some other reaction conditions were chosen based on previous publications [7],

namely 1% (w/w of the substrates) enzyme loading, 67 mmol/L of $CaCl_2$, a volumetric ratio organic to aqueous phase of 2 to 1, 40°C and 20 h of reaction time. The results are shown in Fig. 1.

It can be observed that the highest PC conversion is attained at the greatest excess of the non-limiting substrate in all solvents studied. However, the PLD activity is not exclusively directed toward the formation of phosphatidylbatyl alcohol (PBA) but also to the production of phosphatidic acid (PA) (hydrolysis reaction) (Scheme 1). Two different reasons could be used to explain the preference of PLD toward transphosphatidyl or hydrolysis reactions. On the one hand, *Log P* value determines the partition coefficient of both organic and aqueous phases. Hence, lower values of *Log P* mean better solubility of the aqueous buffer into the organic phase. On the other hand, the solubility at 40°C of both substrates in the organic phase increases as the polarity of the organic solvents is increased (lower values of *Log P*) (Table 1). Thus, transphosphatidyl and hydrolysis reactions are in competition and could produce different proportions of PBA and PA.

The PC conversion to PBA was higher at molar ratio of batyl alcohol to PC of 10 to 1 in all solvents studied, and it decreased as the molar excess of batyl alcohol was reduced. This trend is especially noticeable in the experiments developed with 10 to 1 and 5 to 1 batyl alcohol to PC molar ratios, whereas lower ratio values resulted into similar PC conversion to PBA in every solvent utilized. On the other hand, the use of stoichiometric or near stoichiometric conditions increases the ratio of PA to PBA mainly in the presence of ethyl butyrate and ethyl isovalerate, whereas

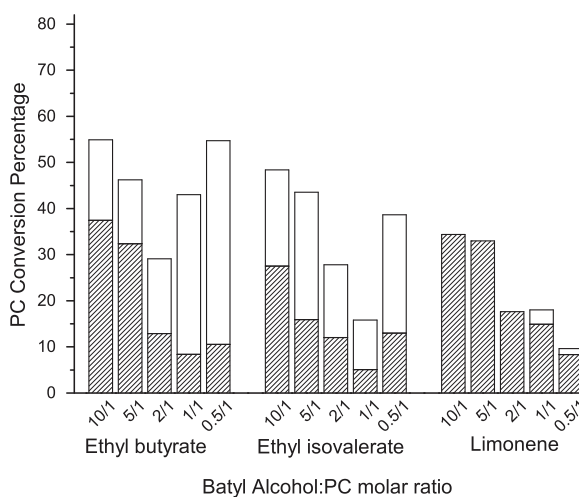


Figure 1. Influence of the molar ratio in the PC conversion in the transphosphatidyl reaction with batyl alcohol with 1% w/w enzyme loading, 67 mmol/L of $CaCl_2$, a volumetric ratio organic to aqueous phase of 2 to 1 after 20 h at 40°C. ▨ Transphosphatidyl reaction, □ Hydrolysis reaction.

reactions developed in limonene barely produced this hydrolysis by-product.

Moreover, in all reactions with excess of one of the reactants, a huge concentration of the non-limiting reactant remains at the end of the bioprocess which complicates downstream processing for the recovery of the new phospholipid produced. For this reason, equimolar conditions were chosen to evaluate the influence of other reaction variables.

3.1.2 Enzyme loading

Next, enzyme loading was investigated in ethyl butyrate, ethyl isovalerate, and limonene. The results are shown in Table 2. It can be observed that enzyme loading had different influence on the different organic phases assayed. Hence, ethyl butyrate reached a maximum PBA production using 3% w/w of PLD, while ethyl isovalerate and limonene attained maximum PBA production with enzyme loadings of 5 and 10% w/w respectively. At the same time, the increment on the enzyme loading resulted in a greater production of PA in all cases. Therefore, both the PBA production and the ratio PBA to PA produced, should be taken into account to select the optimum enzyme loading. Although transphosphatidyl reaction was higher in ethyl butyrate at lower enzyme loading, the hydrolysis reaction was also higher than that obtained with the rest of the solvents investigated. Higher enzyme loading to maximize PBA production and slightly lower hydrolysis compared to the results in ethyl butyrate is observed in ethyl isovalerate. Nevertheless, the most promising ratio PBA to PA produced was attained with limonene. Despite a 10% w/w enzyme loading was needed, the production of PBA was more than four times higher than that for PA. In order to make further experiments comparable each other, a 10% w/w enzyme loading was chosen for all solvents.

3.1.3 Ca^{2+} concentration

Although it has been described that Ca^{2+} is a requirement apparently no significant for PLDs from bacteria [28], previous studies in our group [7] have showed better results

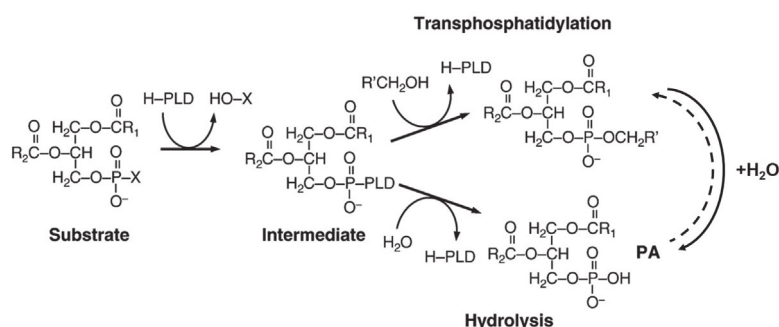
Table 1. Solubility of substrates in the different used solvents at 40°C expressed in mg/mL

	Ethyl butyrate	Ethyl isovalerate	Limonene
PC	7.3	5.3	5.1
Batyl alcohol	45.8	42.9	29.6

in the presence of Ca^{2+} ions. Besides, in precipitation-driven catalysis systems, such as the present study, the addition of specific counter-ions that form poorly soluble salts with an ionic form of the product of the reaction (and not with the substrates) leads to product salts precipitation from the reaction mixture [29]. Table 3 shows the influence of CaCl_2 at different concentrations ranging from 33 to 201 mmol/L. Regardless the solvent used, a greater PC conversion to PBA was reported using 67 mmol/L concentration of CaCl_2 . In order to evaluate the influence of CaCl_2 on the aqueous phase, the pH of the buffer was measured after the addition of different concentration of this salt. A decrease in the pH up to 4.8 at both, 133 and 201 mmol/L of CaCl_2 was observed. This pH reduction could negatively influence on the enzyme activity and could in part, explain the lower conversion obtained at higher CaCl_2 concentrations.

3.1.4 Volumetric proportion of organic solvent and aqueous phase

Next, the relative volumetric proportion of organic solvent and aqueous phase was investigated. It could be hypothesized that an improvement on the transphosphatidyl reaction could be achieved by increasing the soluble fraction of both reactants (batyl alcohol and PC) into the organic phase. Therefore, a volumetric ratio of organic phase to aqueous phase greater than one should produce better transphosphatidyl reaction conversions. Surprisingly, in all solvents studied, a volumetric ratio of organic solvent to aqueous phase of 1 to 2 resulted into greater production of PBA (Fig. 2). However, hydrolysis reaction also increased as the volumetric ratio of aqueous phase to organic phase was



Scheme 1. Schematic representation of the mechanism for the PLD catalyzed hydrolysis and transphosphatidyl reactions.

Table 2. Influence of PLD percentage in the lipid concentration (mmol/L) in the transphosphatidyl reaction between PC and batyl alcohol at equimolar concentration of substrates (21 mmol/L), 67 mmol/L of CaCl₂, a volumetric ratio organic to aqueous phase of 2 to 1 after 20 h at 40°C

PLD loading (w/w)	1%	3%	5%	10%	15%
Ethyl butyrate					
Batyl alcohol	17.93 ± 0.72	15.72 ± 0.63	17.52 ± 0.70	15.82 ± 0.63	16.39 ± 0.66
PC	10.41 ± 0.83	5.47 ± 0.44	5.59 ± 0.45	5.30 ± 0.42	4.51 ± 0.36
PA	3.60 ± 0.29	4.74 ± 0.38	5.67 ± 0.45	7.17 ± 0.57	8.11 ± 0.65
PBA	3.63 ± 0.89	6.36 ± 1.41	5.76 ± 1.05	5.33 ± 0.13	4.89 ± 0.29
Ethyl isovalerate					
Batyl alcohol	19.04 ± 0.76	17.41 ± 0.70	16.68 ± 0.67	17.15 ± 0.69	18.24 ± 0.73
PC	14.82 ± 1.19	7.85 ± 0.63	6.79 ± 0.54	6.38 ± 0.51	6.76 ± 0.54
PA	1.38 ± 0.11	3.25 ± 0.26	3.72 ± 0.30	5.45 ± 0.44	6.80 ± 0.54
PBA	1.61 ± 0.29	5.02 ± 2.11	5.78 ± 1.86	4.86 ± 1.16	3.27 ± 0.98
Limonene					
Batyl alcohol	18.77 ± 0.75	17.49 ± 0.70	17.02 ± 0.68	13.85 ± 0.55	14.70 ± 0.59
PC	14.46 ± 1.16	14.67 ± 1.17	14.11 ± 1.13	10.35 ± 0.83	8.89 ± 0.71
PA	0.55 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.89 ± 0.07	1.57 ± 0.13	1.82 ± 0.15
PBA	2.66 ± 0.05	3.05 ± 0.38	3.30 ± 0.88	6.41 ± 1.11	6.57 ± 0.48

Values shown as mean ± SD reactants and product concentration in mmol/L.

increased, except in limonene, where no more than 2.63 mmol/L of PA (corresponding to 15% of PC conversion) was generated. It should be indicated that although the highest PC conversion was reached in ethyl butyrate, (4.30 ± 0.34 mmol/L of unreacted PC in the final product mixture corresponding to 80% of PC conversion), a preference toward hydrolysis over the tranphosphatidyl reaction was also observed. Similar PC conversion at the optimum volumetric ratio of aqueous phase to organic phase was attained with ethyl isovalerate and limonene (6.65 ± 0.53 and

6.77 ± 0.54 mmol/L of unreacted PC respectively, which corresponds to approximately 68% of PC conversion). However, the percentage of PA in the reaction mixture with ethyl isovalerate was considerably higher than that with limonene. It has been described that the transphosphatidyl reaction in the presence of PLD occurs in the organic solvent/buffer interface and optimum packing density of PC is required at the interface. A general tendency seems to show that highly hydrophobic solvents are not suitable for PLD catalysis since this package is too dense. However, this study

Table 3. Influence of the CaCl₂ molar concentration (mmol/L) in the transphosphatidyl reaction between PC and batyl alcohol at equimolar concentration of substrates (21 mmol/L) after 20 h at 40°C with 10% w/w of PLD and a volumetric ratio organic to aqueous phase of 2 to 1

CaCl ₂ (mmol/L)	33	67	134	201
Ethyl butyrate				
Batyl alcohol	16.59 ± 0.66	15.82 ± 0.63	17.38 ± 0.70	17.14 ± 0.69
PC	5.45 ± 0.44	5.30 ± 0.42	9.65 ± 0.77	11.13 ± 0.89
PA	7.43 ± 0.59	7.17 ± 0.57	5.12 ± 0.41	3.48 ± 0.28
PBA	5.00 ± 0.40	5.33 ± 0.13	3.11 ± 0.35	3.58 ± 0.40
Ethyl isovalerate				
Batyl alcohol	18.32 ± 0.73	17.15 ± 0.69	19.15 ± 0.77	19.89 ± 0.80
PC	8.17 ± 0.65	6.38 ± 0.51	10.84 ± 0.87	11.72 ± 0.94
PA	5.61 ± 0.45	5.45 ± 0.44	4.61 ± 0.37	3.79 ± 0.30
PBA	3.59 ± 0.56	4.86 ± 1.16	1.99 ± 0.44	1.59 ± 1.08
Limonene				
Batyl alcohol	16.74 ± 0.67	13.85 ± 0.55	16.46 ± 0.66	18.02 ± 0.72
PC	9.75 ± 0.78	10.35 ± 0.83	10.27 ± 0.82	12.86 ± 1.03
PA	2.35 ± 0.19	1.57 ± 0.13	2.30 ± 0.18	1.54 ± 0.12
PBA	5.19 ± 0.42	6.41 ± 1.11	4.78 ± 0.42	3.11 ± 0.18

Values shown as mean ± SD reactants and product concentration in mmol/L.

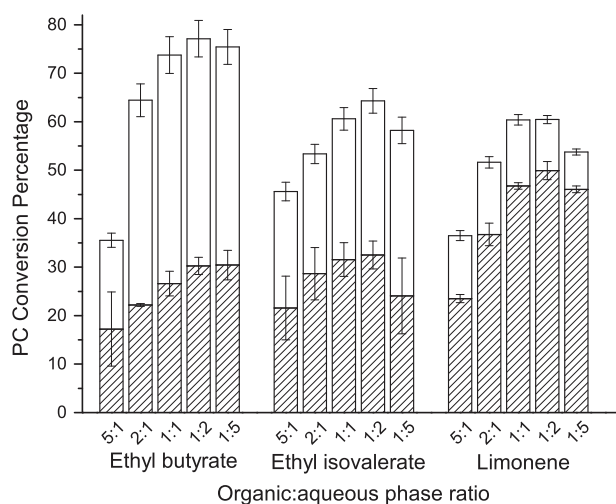


Figure 2. Influence of the relative volumetric proportion of organic solvent to buffer in the equimolar transphosphatidyl reaction between PC and batyl alcohol with 10% w/w enzyme loading, 67 mmol/L of CaCl_2 after 20 h at 40°C. ▨ Transphosphatidyl reaction, □ Hydrolysis reaction.

showed an adequate conversion using limonene, despite its higher hydrophobic properties compared to other solvents studied. It has been observed that in these hydrophobic solvents, PLD activity can be increased by the addition of amphiphilic alcohols, which can intercalate into the interface and reduce the mentioned packing density of PC molecules [30]. Also, PLD inhibition could be related to the interface curvature, whereas the addition of amphiphilic alcohols may lead changes in this interfacial lipid layer bending [31].

Considering the high levels of hydrolysis attained in ethyl butyrate and ethyl isovalerate and the adequate PLD activity observed in limonene further experiments were carried out utilizing limonene as the organic phase of the transphosphatidyl reaction. In order to find the optimum volumetric ratio, an additional reaction using a proportion of limonene to aqueous phase of 1 to 3 was also tested resulting into a remaining PC concentration in the product mixture of 4.95 ± 0.40 mmol/L (76% of PC conversion, which corresponds to the highest PC conversion attained with this organic phase). This volumetric ratio was utilized in further experiments.

3.2 A detailed study of the transphosphatidyl reaction in limonene

First, the time course of the reaction under stoichiometric molar ratio of both reactants (21 mmol/L), 10% PLD (w/w), 67 mmol/L CaCl_2 , 40°C and a volumetric proportion limonene to aqueous buffer 1 to 3, was studied. Figure 3 depicted that there is a lower formation of PA compared to PBA. The hydrolysis reaction reaches an equilibrium after 8 h, whereas the transphosphatidyl reaction progresses even after 24 h, reaching a maximum at 36 h. These results may be caused by

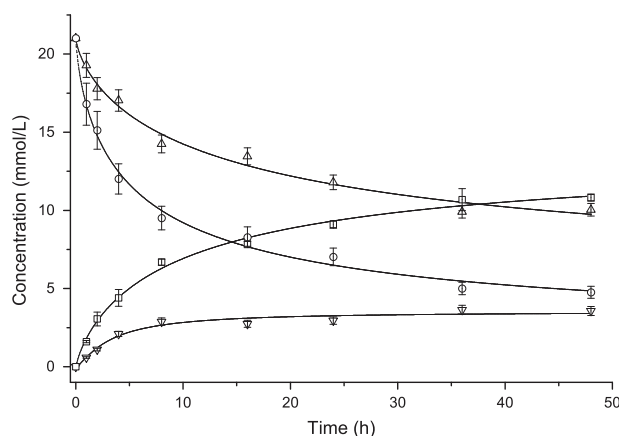


Figure 3. Time course of the disappearance of PC and batyl alcohol and the appearance of PA and PBA during the transphosphatidyl reaction between PC and batyl alcohol at equimolar conditions with 10% w/w enzyme loading, 67 mmol/L of CaCl_2 , a volumetric ratio limonene to aqueous phase 1 to 3 at 40°C. Δ Batyl alcohol, ○ PC, ▽ PA, □ PBA

the solubilization rate of batyl alcohol into limonene at 40°C, which implies that transphosphatidyl reaction progresses as long as the batyl alcohol is dissolving into the organic phase.

In order to improve the volumetric productivity of the process, molar concentration of the substrates was gradually increased from 21 to 168 mmol/L while keeping constant the other process variables. Similar results were attained at 42 mmol/L although higher concentrations resulted into lower PC conversion which clearly reduces a possible industrial application of the process [32].

Taking this result into consideration, a modification on the reaction temperature was suggested as a convenient strategy to improve the results obtained. It can be speculated that besides increasing batyl alcohol solubility in the organic phase, rising the reaction temperature can produce changes in the type of emulsion generated, increasing the fluidity of the phospholipid bilayers and the transition from crystal-liquid state to gel, which might have some advantages on the transphosphatidyl reaction. However, 40°C has been described as the optimum temperature for the PLD utilized in terms of activity and stability. For this reason, although a change in temperature might compromise the optimum PLD activity, we believe that the previously mentioned factors may positively contribute to improve the PC conversion. In this sense, an initial experiment was carried out at stoichiometric molar ratio (21 mmol/L) of PC and batyl alcohol, 10% PLD (w/w), 67 mmol/L CaCl_2 , and a volumetric proportion limonene to aqueous buffer 1 to 3 and 50°C, resulting into the complete conversion of PC, and only 7.89 ± 0.31 mmol/L of remaining batyl alcohol (62% of conversion). It should be noted that none of the transphosphatidyl reactions carried out at 40°C produced a complete disappearance of

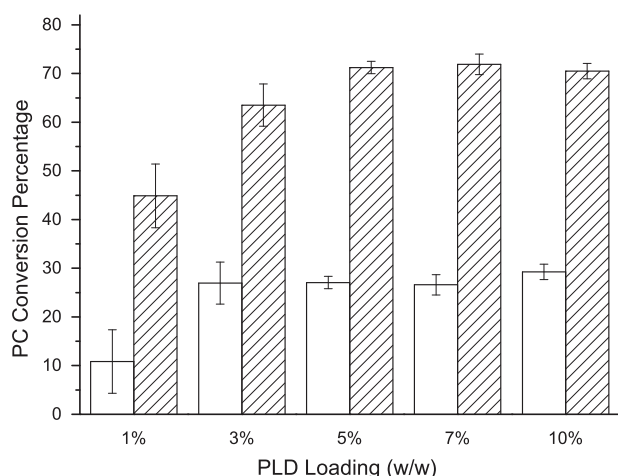


Figure 4. Influence of the PLD loading (w/w) in the PC conversion to PBA and PA in the transphosphatidylation reaction between PC and batyl alcohol at equimolar conditions, with 67 mmol/L of CaCl_2 , a volumetric ratio limonene to aqueous phase 1 to 3 at 50°C after 20 h. ▨ Transphosphatidylation reaction, □ Hydrolysis reaction.

one of the reactants. In addition, the transphosphatidylation reaction was also carried out at 30°C and worse reactant conversions, compared to those at 40 and 50°C, were attained. For this reason, 50°C was set as the reaction temperature in further experiments.

Two factors that can determinate the industrial and economic feasibility of biocatalytic processes: (1) the amount of biocatalyst utilized and (2) the volumetric productivity of the process. Therefore, these two factors were once again studied in order to reduce the necessary enzyme loading to the minimum and to achieve the maximum volumetric productivity of the process. First, an additional study carried out at stoichiometric molar ratio (21 mmol/L) of PC and batyl alcohol, 67 mmol/L CaCl_2 , volumetric proportion limonene to aqueous buffer 1 to 3 and modifying the enzyme loading showed that at 50°C only a 5% w/w of biocatalyst is required for a quantitative consumption of PC. The results in Fig. 4 indicate that similar PC conversion to PA and PBA was

attained at 5, 7, and 10%, whereas 3% of enzyme loading produces similar hydrolysis but lower transphosphatidylation reaction, resulting in 1.82 ± 0.15 mmol/L of unreacted PC in the product mixture (9% by weight of the original PC). Hence, in order to achieve a complete consumption of PC, 5% w/w enzyme loading was utilized to study the volumetric productivity of the process.

The volumetric productivity of the transphosphatidylation reaction (Table 4) was studied at different concentrations ranging from 21 to 168 mmol/L. The results showed that the maximum PBA mmol/L concentration achieved after 20 h was 59.48 ± 3.66 mmol/L utilizing an initial concentration of batyl alcohol and PC of 126 mmol/L. Nevertheless, similar results were attained at 84 mmol/L (52.58 ± 0.21) and 106 mmol/L (56.30 ± 11.52) of batyl alcohol and PC, although with slightly higher PA concentration (12.23 ± 0.51 and 11.52 ± 0.42 , respectively) compared to that at 126 mmol/L (9.83 ± 0.36).

It should be pointed out that visual inspection of the reaction mixtures at 168 mmol/L of batyl alcohol and PC showed noticeable changes in their physical appearance. The reaction mixture became a solid mass probably limiting contact and diffusion of the reactants with the enzyme and decreasing the productivity of the process.

Finally, time course of the reaction was studied at 50°C. According to the results of the volumetric productivity study, reactions were carried out at stoichiometric molar ratio of the reactants and two concentrations, namely 84 and 126 mmol/L, utilizing 67 mmol/L CaCl_2 , 5% w/w PLD and a volumetric proportion limonene to aqueous buffer of 1 to 3. Figure 5 shows the time course of the transphosphatidylation reaction. It can be observed that transphosphatidylation reaction is slightly faster at 84 mmol/L than at 126 mmol/L (34 and 23 mmol/L of PBA were obtained after 2 h of reaction). The reaction equilibrium was reached after 36 and 48 h utilizing 84 and 126 mmol/L, respectively. Similar PC conversion was attained at both reactant concentrations (63% of PC conversion at 84 mmol/L and 61% of PC conversion at 126 mmol/L). The maximum PBA concentration in the product mixture was 53 and 77 mmol/L at 84 and 126 mmol/L, respectively. Consequently, according to these

Table 4. Influence of the substrates molar concentration (mmol/L) in the transphosphatidylation reaction between PC and batyl alcohol after 20 h with 5% w/w of PLD at 50°C, 67 mmol/L of CaCl_2 and a volumetric ratio limonene to aqueous phase 1 to 3

PC (mmol/L)	Batyl alcohol (mmol/L)	Produced PBA (mmol/L)	Produced PA (mmol/L)	Remaining PC (mmol/L)	Remaining batyl alcohol (mmol/L)
21.00	21.00	13.43 ± 0.00	5.40 ± 0.43	0.11 ± 0.01	7.77 ± 0.31
42.00	42.00	23.09 ± 2.61	11.91 ± 0.95	4.72 ± 0.38	17.10 ± 0.68
84.00	84.00	52.58 ± 0.21	12.23 ± 0.51	10.52 ± 0.44	31.96 ± 0.66
106.00	106.00	56.30 ± 0.05	11.52 ± 0.42	26.65 ± 0.97	49.37 ± 0.90
126.00	126.00	59.48 ± 3.66	9.83 ± 0.36	41.56 ± 1.50	69.68 ± 1.26
168.00	168.00	36.01 ± 0.54	3.32 ± 0.07	112.23 ± 2.42	131.95 ± 1.42

Values shown as mean \pm SD.

results, higher volumetric productivity was attained at 126 mmol/L. Regarding PA production, similar concentration of this by-product was attained at equilibrium for both experiments (22 mmol/L at 84 mmol/L and 24 mmol/L at 126 mmol/L). This result indicates that higher hydrolysis is produced at 84 mmol/L (26% w/w of PA), than at 126 mmol/L (19% w/w of PA). Finally, it should be also noted that at both concentration assayed, kinetics of the transphosphatidyl reaction at 50°C were faster than those performed at 40°C (Fig. 4).

3.3 Purification of transphosphatidyl reaction at gram scale

The transphosphatidyl reaction between PC and batyl alcohol at 126 mmol/L and 50°C, was scaled up to 48 mL of

biphasic medium (comprised of limonene and sodium acetate buffer 1 to 3 [v/v]) and containing 67 mmol/L CaCl_2 and 5% w/w PLD. The enzymatic reaction was stopped after 48 h to recover PBA from the reaction mixture. For that matter, the product mixture was centrifuged and three phases comprised of an aqueous buffer, limonene, and a solid phase containing mainly PBA were separated. It should be noted that the solid phase contained residual amounts of limonene and aqueous buffer, which should be removed in order to eliminate unreacted batyl alcohol and PC and also to remove choline produced and PLD. Hence, the solid phase was washed twice with 24 mL of limonene and three times with 36 mL of distilled water. Finally, the solid isolated was freeze-dried, obtaining 5.9 g of a solid product comprised of 73% PBA, 15% PA, 9% batyl alcohol, and 3% of unreacted PC.

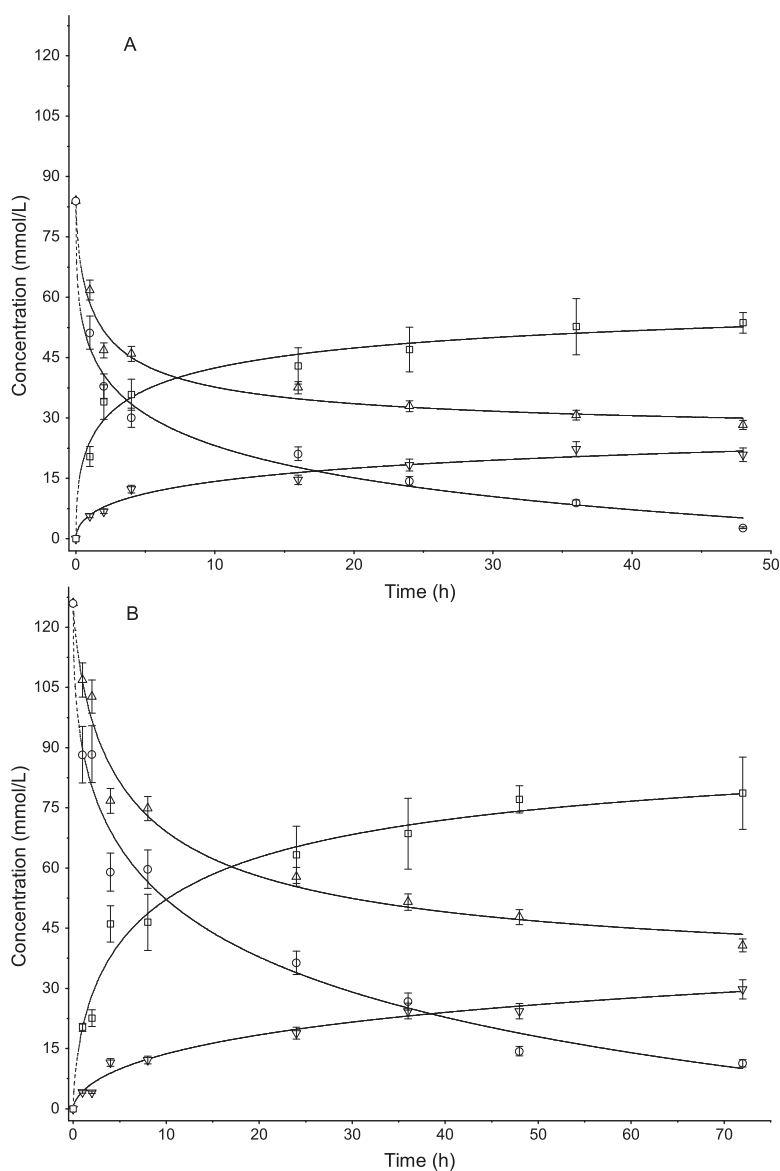


Figure 5. Time course of the disappearing of PC and batyl alcohol and the appearance of PA and PBA during the transphosphatidyl reaction between PC and batyl alcohol at 84 mmol/L (A) and 126 mmol/L (B), with 5% w/w enzyme loading, 67 mmol/L of CaCl_2 , a volumetric ratio limonene to aqueous phase 1 to 3 equimolar conditions at 50°C. Δ Batyl Alcohol, \circ PC, ∇ PA, \square PBA.

4 Conclusions

The present work shows an efficient and readily scalable solid to solid transphosphatidylolation reaction in a GRAS biphasic reaction medium for the production of a novel glyceryl ether phospholipid in the presence of a food grade PLD. Different reaction conditions have been studied based on previous experiences in enzymatic transphosphatidylations. According to previous results, the chemical nature of the nucleophile utilized in transphosphatidylolation reactions requires specific reaction conditions in terms of salt concentration, organic phase and aqueous phase compositions and proportions, and temperature, to achieve optimum conversion and product purity, as well as minimizing the undesired hydrolysis reaction. For this reason, limonene was chosen as the organic phase of the process based on the preference of PLD to catalyze transphosphatidylolation versus hydrolysis in this reaction medium. It should be mentioned that the reaction temperature played an essential role in the reaction probably caused by an increase in the substrates solubility and also because at 50°C, a more fluid reaction mixture with less mass transfer and diffusional limitation was attained. In addition, compared to the reaction at 40°C, the enzyme loading was reduced from 10 to 5% w/w. Furthermore, a volumetric proportion limonene to aqueous buffer 1 to 3 could increase the interfacial area between organic and aqueous phases and improve the transphosphatidylolation reaction compared to other volumetric ratios studied. Finally, 67 mmol/L CaCl₂ provided the best results probably caused the formation poorly soluble salts with an ionic form of the product of the reaction leading to product salts precipitation from the reaction mixture.

As a result of this procedure, 5.9 g (87% yield) of this novel compound were prepared with purity higher than 70% to test its potential as both bioactive lipid and lipid-based delivery system.

This study has been funded by Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD, project number S2013/ABI-2728) and by Ministerio de Economía y Competitividad (project number AGL2013-48943-C2-1-R). The contract of Pablo Arranz-Martínez was supported by Ministerio de Economía y Competitividad and the European Social Fund: BES-2014-070395. Víctor Casado also acknowledge CONICYT FONDECYT Postdoc 2015 project number 3150376.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Dippe, M., Mrestani-Klaus, C., Schierhorn, A., Ulbrich-Hofmann, R., Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups. *Chem. Phys. Lipids* 2008, 152, 71–77.
- [2] Servi, S., Phospholipases as Synthetic Catalysts, in: Fessner W.-D., Archelas A., Demirjian D. C., Furstoss R., Griengl H., Jaeger K. E., Moris-Varas E., Öhrlein R., Reetz M. T., Raymond J. L., Schmidt M., Servi S., Shah P. C., Tischer W., Wedekind F. (Eds.) *Biocatalysis – From Discovery to Application*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 1999, pp. 127–158.
- [3] Yamamoto, Y., Kurihara, H., Miyashita, K., Hosokawa, M., Synthesis of novel phospholipids that bind phenylalkanols and hydroquinone via phospholipase D-catalyzed transphosphatidylolation. *New Biotechnol.* 2011, 28, 1–6.
- [4] Hossen, M., Hernandez, E., Phospholipase D-catalyzed synthesis of novel phospholipid-phytosterol conjugates. *Lipids*. 2004, 39, 777–782.
- [5] Ulbrich-Hofmann, R., Phospholipases Used in Lipid Transformations, in: Bornscheuer U. T. (Eds.) *Enzymes in Lipid Modification*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 2005. pp. 217–262.
- [6] Woodley, J. M., Bisschops, M., Straathof, A. J. J., Ottens, M., Future directions for in-situ product removal (ISPR). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008, 83, 121–123.
- [7] Casado, V., Reglero, G., Torres, C. F., Novel and efficient solid to solid transphosphatidylolation of two phenylalkanols in a biphasic GRAS medium. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2014, 99, 14–19.
- [8] Grasso, S., Siracusa, L., Spatafora, C., Renis, M., Tringali, C., Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg. Chem.* 2007, 35, 137–152.
- [9] Duan, Z.-Q., Hu, F., Highly efficient synthesis of phosphatidylserine in the eco-friendly solvent [gamma]-valerolactone. *Green Chem.* 2012, 14, 1581–1583.
- [10] Woodley, J. M., New opportunities for biocatalysis: Making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 321–327.
- [11] Engström, S., Wadsten-Hindrichsen, P., Hernius, B., Cubic, sponge, and lamellar phases in the glyceryl monooleyl ether–propylene glycol–water system. *Langmuir* 2007, 23, 10020–10025.
- [12] Magnusson, C. D., Haraldsson, G. G., Ether lipids. *Chem. Phys. Lipids* 2011, 164, 315–340.
- [13] Krishnan, L., Dicaire, C. J., Patel, G. B., Sprott, G. D., Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: Comparison to conventional liposomes and alum. *Infect. Immun.* 2000, 68, 54–63.
- [14] Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Côté, J.-P., Whitfield, D. M., Adjuvant potential of archaeal synthetic glycolipid mimetics critically depends on the glyco head group structure. *Glycobiology*. 2008, 18, 559–565.
- [15] Cheminade, C., Gautier, V., Hichami, A., Allaume, P., et al., 1-O-alkylglycerols improve boar sperm motility and fertility. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 421–428.
- [16] Torres, C. F., Martin, D., Torrelo, G., Casado, V., et al., Lipids as delivery systems to improve the biological activity of bioactive ingredients. *Curr Nutr Food Sci.* 2011, 7, 160–169.
- [17] Gupta, S., Kesarla, R., Omri, A., Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharmaceutics*. 2013, 2013, 16.
- [18] Martin, D., Moran-Valero, M. I., Casado, V., Reglero, G., Torres, C. F., Phosphatidyl derivative of hydroxytyrosol. In

- vitro intestinal digestion, bioaccessibility, and its effect on antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 9751–9759.
- [19] Yamamoto, Y., Hosokawa, M., Kurihara, H., Maoka, T., Miyashita, K., Synthesis of phosphatidylated-monoterpene alcohols catalyzed by phospholipase D and their antiproliferative effects on human cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 4044–4046.
- [20] Liu, W., Ye, A., Singh, H., in: Leonard, M. C. (Ed.), *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Academic Press, San Diego 2015, pp. 151–170.
- [21] Elnaggar, Y. S., Multifaceted applications of bile salts in pharmacy: An emphasis on nanomedicine. *Int. J. Nanomed.* 2015, 2015, 3955–3971.
- [22] Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 145–160.
- [23] Patel, G. B., Sprott, G. D., Archaeobacterial ether lipid liposomes (Archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1999, 19, 317–357.
- [24] Benvegnu, T., Rethore, G., Brard, M., Richter, W., Plusquellec, D., Archaeosomes based on novel synthetic tetraether-type lipids for the development of oral delivery systems. *Chem. Commun.* 2005, 5536–5538.
- [25] Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J.-I., Balogh, G., et al., Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog. Lipid Res.* 2015, 59, 38–53.
- [26] Mellal, D., Zumbuehl, A., Exit-strategies – Smart ways to release phospholipid vesicle cargo. *J. Mat Chem B* 2014, 2, 247–252.
- [27] Uesugi, Y., Hatanaka, T., Phospholipase D mechanism using streptomyces PLD. *BBA – Mol. Cell Biol. L* 2009, 1791, 962–969.
- [28] Ulbrich-Hofmann, R., Lerchner, A., Oblozinsky, M., Bezakova, L., Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnol. Lett.* 2005, 27, 535–544.
- [29] Basso, A., Cantone, S., Ebert, C., Halling, P. J., Gardossi, L., Biocatalysis with Undissolved Solid Substrates and Products, in: Carrea, G., Riva S. (Eds.), *Organic Synthesis With Enzymes in Non-Aqueous Media*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 2008. pp. 279–301.
- [30] Hirche, F., Koch, M. H. J., König, S., Wadewitz, T., Ulbrich-Hofmann, R., The influence of organic solvents on phospholipid transformations by phospholipase D in emulsion systems. *Enzyme Microb. Technol.* 1997, 20, 453–461.
- [31] Hirche, F., Ulbrich-Hofmann, R., The interfacial pressure is an important parameter for the rate of phospholipase D catalyzed reactions in emulsion systems. *BBA – Mol. Cell Biol. L* 1999, 1436, 383–389.
- [32] Pollard, D. J., Woodley, J. M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: The future is now. *Trends Biotechnol.* 2007, 25, 66–73.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

El principal objetivo que persigue el uso de sistemas de vehiculización lipídicos es un aumento en la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los compuestos transportados. Para ello, existen en la bibliografía numerosas alternativas ya implementadas, y todas ellas presentan una serie de ventajas e inconvenientes. El trabajo llevado a cabo durante la presente Tesis Doctoral se ha basado en el desarrollo de nuevas formulaciones que logran proporcionar un efecto beneficioso adicional a los posibles compuestos bioactivos que pudieran transportar. Para ello, se seleccionaron los AKGs como los compuestos con los que trabajar en las líneas de investigación tratadas, debido al carácter innovador de su uso en formulaciones lipídicas y a las propiedades bioactivas que presentan.

En la naturaleza, estos compuestos se encuentran habitualmente esterificados en las posiciones *sn*-2 y *sn*-3, formando DAKG, y su principal fuente de obtención son los aceites de hígado de tiburón. Para encontrarlos como AKGL es necesario recurrir a métodos de modificación química. En cualquiera de los casos, estas moléculas presentan un grado de digestibilidad muy bajo, un inconveniente que limita su bioaccesibilidad. Por ello, la administración de estos compuestos sin modificar, ya sea en su forma natural como DAKG, o en su forma libre, no es eficiente en términos de bioactividad.

La falta de digestibilidad de los aceites compuestos principalmente por DAKG puede ser solventada mediante un proceso enzimático que genere una mezcla de reacción con una mayor biocompatibilidad, de modo que las enzimas digestivas puedan actuar de manera más eficiente. Con este fin, se eligió la reacción de glicerolisis enzimática, gracias a la mezcla de glicéridos que se origina como producto de reacción, de gran biocompatibilidad y mayor polaridad, lo que le confiere una mayor capacidad emulsionante, debido principalmente a la presencia de MAG.

Como estrategia adicional para aumentar la bioaccesibilidad de los AKGL en su uso en formulaciones lipídicas y con el fin de que estos vehículos puedan aportar una bioactividad adicional al compuesto vehiculizado, se planteó la posibilidad de su unión a un compuesto altamente digerible, como la FC, recurriendo a la reacción de transfosfatidilación enzimática, catalizada por la FLD.

Ambos procesos enzimáticos, la glicerolisis y la transfosfatidilación, han sido ampliamente estudiados en la bibliografía [138, 146]. Sin embargo, a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se ha marcado como reto la optimización de estos procesos bajo las directrices

marcadas por la *Química Verde*, haciendo uso de disolventes GRAS, lo que le confiere un carácter innovador.

4.1 Desarrollo de un vehículo lipídico a partir de aceite de hígado de tiburón quimera

La caracterización inicial del aceite de partida mediante técnicas de HPLC y GC, sirvió para determinar el perfil lipídico y el perfil de AGs respectivamente. En primer lugar, se verificó el alto contenido de este aceite en DAKG (80% p/p), en comparación con TAG (20% p/p). Por otra parte, el acidograma mostró que los AGs mayoritarios eran el ácido oleico (C18:1 – 43% p/p) y el ácido palmítico (C16:0 – 13% p/p). Fue especialmente destacable que el contenido en AGPIs de cadena larga era inferior a otros aceites de origen marino (12% p/p). Este hecho es importante de cara a su uso en formulaciones lipídicas, ya que puede aportarle una mayor estabilidad frente a procesos oxidativos en comparación con otros aceites de origen marino.

La glicerolisis enzimática de aceites con mezclas de DAKG y TAG no ha sido estudiada en la bibliografía. Sin embargo, estudios de otros procesos como la etanolisis enzimática, mostraron que puede existir una discriminación hacia la conversión de DAKG [141], por lo que era necesario realizar un ensayo previo mediante el cual poder estimar qué biocatalizador podía ser más efectivo de cara a la conversión tanto de TAG como de DAKG. Para ello, la reacción de glicerolisis enzimática se llevó a cabo según la metodología descrita por Torres y col. [140].

De este modo, se evaluó la actividad de cinco enzimas, tres de ellas inmovilizadas (*Candida antarctica*, *Alcaligenes sp.* y *Rhizopus oryzae*) y dos sin inmovilizar (*Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas stutzeri*) durante un tiempo de reacción de 48 h. Todas las enzimas estudiadas mostraron una conversión final de TAG similar (60 – 67 %). En cuanto a la conversión de DAKG fue mayor en el caso de reacciones catalizadas por enzimas no inmovilizadas (~75%) que aquellas inmovilizadas (~32 – 40%). Este resultado se puede atribuir a dos factores: por una parte, puede existir una menor discriminación enzimática hacia la conversión de DAKG por parte de las enzimas no inmovilizadas; adicionalmente, podría estar debido a la mayor superficie de contacto que presentan las enzimas en polvo que aquellas inmovilizadas en un soporte enzimático, que puede limitar la difusión de algunos sustratos. Sin embargo, las reacciones catalizadas por estas enzimas sin inmovilizar dieron lugar a AGL en

las mezclas finales de reacción, derivado de la reacción de hidrólisis que se puede producir de manera paralela y no deseada, lo que haría necesario un proceso adicional para su eliminación. Además, pese a obtener tasas de conversión *a priori* más bajas, las enzimas inmovilizadas presentan una serie de ventajas de cara a su uso en procesos industriales, como la posibilidad de reutilización y una mayor estabilidad que prolonga su actividad catalítica, por lo que el uso de estas enzimas no fue descartado.

Pese a los resultados obtenidos, hay que recordar que uno de los objetivos era conseguir un sistema con unas propiedades autoemulsionables, y esto se puede alcanzar gracias a la presencia de MAG en el medio de reacción en proporciones superiores al 30% p/p [118]. Sin embargo, el contenido final de MAG en la mezcla de reacción, tanto para las lipasas inmovilizadas (2% p/p) como para las no inmovilizadas (8% p/p), en ambos casos fue insuficiente para dar lugar a un sistemas con adecuadas propiedades emulsionantes. Esto podría ser debido a reacciones secundarias entre el MAG generado y el resto de glicéridos presentes en la mezcla, provocado por una mayor solubilidad del MAG respecto a la glicerina, lo que favorecería su utilización frente a la glicerina como sustrato de la reacción.

Con el fin de abordar la falta de solubilidad del glicerol en aceite, se planteó el uso de un disolvente que generase un medio homogéneo y que favoreciese la tasa de difusión y la transferencia de materia. Así, para evitar el uso de disolventes orgánicos volátiles, se hizo una selección de disolventes GRAS en función de su polaridad, incluyendo ciclopentanona y hexanal o disolventes considerados más inocuos y seguros que los disolventes orgánicos convencionales, como el ciclopentil-metil éter. Finalmente, tras un estudio para comprobar la solubilidad del glicerol en los distintos disolventes seleccionados, la ciclopentanona mostró ser la más adecuada, por lo que la optimización de la reacción se llevó a cabo con este disolvente como medio de reacción.

El uso de este disolvente provocó la generación de una serie de agregados en la reacción catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*, lo cual dificultó el acceso de DAKG y TAG al centro activo de la enzima, reduciendo la velocidad de la reacción y la conversión final de los sustratos. Además, también se observó reacción de hidrólisis, por lo que se descartó el uso de este biocatalizador.

Sin embargo, esta estrategia mostró resultados muy satisfactorios para el uso de la lipasa de *Candida antarctica* como biocatalizador de la reacción, ya que se consiguió alcanzar

la completa conversión de TAG, y una conversión de DAGE del 65% tras 8 h de reacción, con un contenido final en MAG superior al 30% establecido como objetivo (32% p/p). El producto de reacción contenía además DAKG sin reaccionar (28% p/p) y 2-MAKG + DAG (40% p/p).

De este modo, se definieron las condiciones óptimas de reacción, siendo éstas el uso de una relación estequiométrica aceite:glicerina 1:1, 40 °C de temperatura, la presencia de 67% (p/p) de ciclopentanona como medio de reacción y una agitación de 200 rpm, usando como biocatalizador la lipasa de *Candida antarctica* en una relación 1:10 (p/p) respecto al aceite.

Entre los objetivos finales de cualquier optimización de un proceso enzimático debe estar poder conferirle una aplicabilidad a nivel industrial, y para ello es necesario que se puedan alcanzar volúmenes de producción rentables y que se minimicen los costes [195]. Uno de los aspectos claves en el balance económico de un proceso enzimático suele ser el gasto que genera el uso de biocatalizadores. Por tanto, es importante realizar un estudio pormenorizado que permita valorar la viabilidad de la recuperación del biocatalizador tras un ciclo de reacción y la reutilización del mismo en ciclos consecutivos, intentando predecir si va a existir y cuándo se va a producir una inactivación enzimática. La recuperación eficaz del disolvente utilizado como medio de reacción y su posterior reutilización también resulta clave para la viabilidad industrial del proceso.

Así pues, se evaluó el escalado de la reacción de glicerolisis, a un volumen de producción 12 veces superior del proceso optimizado a escala de laboratorio. Este escalado se llevó a cabo en un reactor tipo tanque agitado Kiloclave (Buchi Glas Uster, Büchigalsuster, Suiza), de 1 L de capacidad, equipado con una camisa termostatzada. Las condiciones de reacción fueron las que produjeron los mejores resultados en el estudio de optimización previo, aunque fueron necesarias unas ligeras modificaciones del proceso. Estos cambios fueron principalmente que la enzima pasó de estar en suspensión en el medio de reacción, a estar confinada en una cesta acoplada al eje de agitación, rodeada por una malla metálica con un tamaño de poro de 100 µm, que permitiese el contacto entre el biocatalizador y el medio de reacción. De este modo, se permite una sencilla recuperación de la enzima tras los ciclos de reacción. El producto de reacción se recuperó mediante destilación de la ciclopentanona a vacío, usando un rotavapor RV10 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), y tanto su rendimiento en peso como su composición fueron determinadas.

Un primer ciclo de reacción permitió la recuperación del producto final de reacción con un 92.4% de rendimiento en peso, mientras que el disolvente evaporado y recuperado supuso un 93.9% respecto al peso inicial de ciclopentanona empleada. Estos valores son incluso más relevantes si tenemos en cuenta que parte del medio de reacción no se pudo recuperar ya que este se queda impregnado en el biocatalizador inmovilizado. Cada ciclo de reacción se detuvo tras 48 h, y se controló el desarrollo de la misma mediante la toma de alícuotas a determinados tiempos de reacción, lo cual permitió determinar que el equilibrio de reacción no se alcanzaba hasta las 24 h de reacción. Esto tiene sentido si tenemos en cuenta que la difusión del medio de reacción y el contacto con el biocatalizador se encuentra limitado por estar éste encerrado en la cesta descrita anteriormente. Pese a esta diferencia, las tasas de conversión fueron similares a las obtenidas en el estudio de optimización, por lo que se determinó que el proceso era potencialmente escalable.

Una vez confirmada la viabilidad del proceso a volúmenes de reacción superiores, se decidió evaluar la recuperación y reutilización del biocatalizador en ciclos consecutivos de reacción, de modo que permitiera desarrollar un modelo matemático para evaluar la discriminación hacia la conversión de DAKG y estimar la tasa de inactivación enzimática.

El modelado cinético se basó en estudios previos de la bibliografía [196-198], en los que se tuvieron en cuenta constantes cinéticas de aparición de productos, desaparición de sustratos y la posible reversibilidad de la reacción de glicerolisis, según ecuaciones de primer orden. Haciendo uso del concepto “*pseudotiempo de reacción*” introducido por Malcata y col. [196], se establecieron las ecuaciones 1 y 2, que permiten determinar matemáticamente las tasas de desaparición de los sustratos, TAG y DAKG.

$$-r_{TAG} = \frac{dTAG}{dt} = \Theta_I[TAG][G] + \Theta_{II}[TAG][MAG] - \Theta_{III}[MAG] \quad \text{Ec. 1}$$

$$-r_{DAKG} = \frac{dDAKG}{dt} = \Theta_{IV}[DAKG][G] + \Theta_V[DAKG][MAG] - \Theta_{VI}[MAG] \quad \text{Ec. 2}$$

Por otra parte, la ecuación 3, sirvió para calcular la constante cinética de inactivación y la vida media del biocatalizador.

$$a\{t\} = a_0 \exp[-k_d(t - t_0)] \quad \text{Ec. 3}$$

Se llevaron a cabo de manera consecutiva varios ciclos de reacción reutilizando el mismo lote de lipasa, que se dividieron en dos sets. El primer set consistió en cinco ciclos de 48 h de reacción, y el segundo en diez ciclos de 24 h de reacción, de modo que en ambos casos el biocatalizador acumuló 240 h de uso. Al finalizar cada ciclo, se recuperó el producto final, que se llevó a evaporación, recuperando así el disolvente que se pudo reutilizar en los siguientes ciclos de reacción.

En el primero de los sets, se determinó que la tasa de conversión de TAG era 1.8 veces superior que para su análogo éter, lo cual verifica que existe una discriminación hacia la conversión de DAKG, más aun teniendo en cuenta que la concentración de DAKG en el aceite de partida es cuatro veces superior para la de TAG. Además, se calculó la actividad enzimática en cada ciclo y se estimó en 145 h la vida media de la enzima, entendiendo este término como el tiempo en el que el biocatalizador pierde el 50% de su actividad.

En el segundo de los sets, el tiempo de uso de la enzima fue el mismo que en el primero, 240 h. Sin embargo, el hecho de que fuesen 10 ciclos implica que se llevaron a cabo el doble de reacciones, con un tiempo de uso efectivo superior, poniendo en contacto la enzima con los sustratos y el disolvente un mayor número de veces durante el mismo período de tiempo. Sin embargo, estas diferencias no tuvieron una gran influencia sobre la actividad enzimática, que se comportó de manera similar que en el primer set, con una tasa de conversión de TAG 1.6 veces superior al DAKG y un tiempo de inactivación enzimática de 146 h.

Para determinar si la falta de actividad biocatalítica podía venir dada por una inactivación enzimática o por la acumulación de subproductos e impurezas en el soporte enzimático, que pudiesen limitar la transferencia de masa, se diseñó un tercer set de ciclos. En este último grupo de experimentos, se llevaron a cabo cinco ciclos de 24 h de duración, seguidos por un proceso de lavado de la enzima con una mezcla de hexano/etanol 50/50 v/v. A continuación, se eliminaron los disolventes mediante aplicación de vacío, y se reutilizó la enzima lavada y seca en otros cinco ciclos de 24 h. De este modo, se calculó la constante de inactivación de dicha enzima lavada, que en este caso resultó ser 3 veces superior al resultado obtenido en los otros dos sets experimentales. Este valor descartó la hipótesis de que se produjese algún recubrimiento de la enzima inmovilizada que dificultase la transferencia de masa, y que fuese un proceso reversible.

En base a la bibliografía, el estado oxidativo del aceite de partida para los procesos de transesterificación enzimática debe tener unos valores mínimos para un correcto desarrollo de la reacción [199]. El aceite utilizado para esta línea investigación se trataba de un aceite sin refinar, con un valor de hidroperóxidos de 16.59 ± 1.92 meq O_2 /kg y un valor de anisidina de 4.53 ± 0.23 . Sin embargo, tras el proceso enzimático, estos valores disminuyeron a 13.95 ± 0.71 meq O_2 /kg y 2.60 ± 0.00 respectivamente. Este descenso en los valores de oxidación puede estar debido a que estos compuestos de oxidación puedan quedarse atrapados en el soporte enzimático. De igual manera, también podría deberse a la generación de radicales libres a partir de estos compuestos de oxidación, que no se cuantifican en las técnicas utilizadas. Estos nuevos compuestos generados a partir de aceites con estados oxidativos altos, pueden ser los responsables de la acelerada inactivación enzimática observada [200].

La obtención del producto de glicerolisis enzimática del aceite de tiburón *quimera* en una escala de producción superior, permitió poder obtener un producto con el cual llevar a cabo análisis posteriores relacionados con la inclusión de compuestos bioactivos dentro de su matriz.

La incorporación de compuestos bioactivos en sistemas de vehiculización lipídica se efectúa mediante la solubilización o la dispersión de dicho compuesto en la matriz lipídica en estado líquido, utilizando temperaturas 5-10 °C superiores a su temperatura de fusión. Este proceso no tiene una duración determinada, y se extiende hasta que se obtiene una mezcla homogénea. Una vez conseguida, se lleva a cabo el enfriamiento de la mezcla, lo que conlleva la generación de un estado cristalino de la matriz lipídica. La ordenación y grado de empaquetamiento de las moléculas del vehículo lipídico, así como las posibles transiciones polimórficas, van a tener una gran influencia sobre la capacidad de carga y la estabilidad del compuesto dentro dicho sistema. Por esta razón, se llevó a cabo un estudio del comportamiento cristalino del vehículo obtenido a partir de la reacción de glicerolisis enzimática de aceite de tiburón *quimera*.

En primer lugar, se evaluó el comportamiento térmico tanto del producto de glicerolisis como del aceite original mediante DSC. Para ello, se llevó a cabo el enfriamiento de las muestras desde 50 °C hasta -70 °C, para posteriormente calentarlo de nuevo hasta 50 °C, utilizando una rampa de temperatura de 5 °C/min. El proceso de cristalización del aceite original no comenzó hasta -8 °C, lo cual está en consonancia con el estado líquido que presenta a temperatura ambiente. Debido a la complejidad del perfil de ácidos grasos de este aceite, el proceso de cristalización describió una señal ancha y poco marcada, un fenómeno ya descrito

para otros aceites de origen marino [201], presentando un pico mayoritario en $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el caso del producto de glicerolisis, la presencia del MAG sintetizado, originó un proceso de cristalización a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este valor es ligeramente inferior al observado para mezclas de MO en aceites [181], por lo que las moléculas de MAG presentes en la muestra podría ser una mezcla de MO y otros MAG de carácter poliinsaturado.

La curva de fusión permitió establecer la temperatura de fusión del producto de glicerolisis en $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de este dato, se determinó que para simular el proceso de inclusión de un compuesto bioactivo en el vehículo, la temperatura de trabajo debía ser $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, suficiente para que la mezcla se encontrase en estado líquido, pero sin llegar a ser una temperatura tan alta que pudiese acelerar los procesos oxidativos.

Con el fin de simular el proceso de inclusión de un compuesto bioactivo en la matriz lipídica, se desarrolló un estudio en el cual el producto de glicerolisis se expuso a la temperatura de trabajo durante diferentes intervalos de tiempo, de 0 a 24 h, para posteriormente analizar el comportamiento térmico de cristalización y fusión. De este modo se observó que aquellas muestras que habían sido calentadas durante más de 180 min, reflejaban una disminución de aproximadamente $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ tanto en los picos de cristalización como de fusión, mientras que este efecto no se observó en los tiempos más cortos de calentamiento. Este hecho puede estar relacionado con la existencia de núcleos de cristalización que no se eliminan en períodos cortos de calentamiento, un fenómeno denominado “memoria del cristal”. Para descartar esta posibilidad, se llevó a cabo un experimento adicional, donde se sometió al producto a ciclos cortos de calentamiento, durante 20 min, y enfriamiento, durante 10 min, que se repitieron tres veces con la misma muestra, observando que de nuevo volvía a producirse la disminución de los valores de cristalización y fusión. Si durante ciclos de calentamiento cortos la memoria del cristal desapareciese, este experimento tendría que haber mostrado un resultado similar. Sin embargo, la disminución de los valores de los parámetros analizados, indica que puede existir un efecto acumulativo del tratamiento térmico sobre su comportamiento cristalino.

El análisis de las cinéticas de nucleación corroboró la diferencia observada en el proceso de cristalización entre las muestras sometidas a distintos tiempos de calentamiento. De este modo, las muestras con un mayor tiempo de residencia a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ describieron cinéticas más lentas. Además se comprobó el posible efecto acumulativo de procesos cortos de calentamiento sobre la velocidad de cristalización.

La diferencia observada en las propiedades térmicas del producto está directamente relacionada con la estructura cristalina formada, y más en concreto con la metaestabilidad de la misma. Por esa razón, se llevó a cabo un estudio mediante XRD de muestras sometidas a 20 min y 180 min de calentamiento respectivamente. Inmediatamente después del enfriamiento, se produjo una cristalización de ambas muestras en fase α . Sin embargo, tras el almacenamiento de la muestra en refrigeración, se observó que la muestra calentada durante menos tiempo sufrió una transformación polimórfica a cristales en fase β , mientras que la muestra calentada durante más tiempo se mantuvo en fase α durante el período de almacenamiento estudiado. Este hecho es relevante en el sentido de que dichas transformaciones pueden suponer una expulsión del compuesto bioactivo transportado [202].

Mediante técnicas de microscopía de luz polarizada se observó que la formación de cristales en los tiempos iniciales de cristalización se producía a través de la aparición de estructuras tipo agujas para las dos muestras, mientras que la evolución en el tiempo dio lugar a una reestructuración que resultó en una distinta conformación, evidenciando que el comportamiento cristalino del producto de glicerolisis puede presentar diferencias en función del tratamiento térmico empleado en su manejo.

4.2 Desarrollo de un vehículo lipídico a partir de AKGL

Haciendo uso del proceso de transfosfatidilación enzimática catalizada por FLD, se estudió la optimización de la unión de un AKGL, en particular el batil alcohol, a la cabeza polar de un FL, en concreto de FC. La nueva molécula generada, el fosfatidilbatil alcohol, presenta dos potenciales ventajas respecto al AKGL sin modificar: i) un aumento de la bioaccesibilidad del AKGL y ii) una mayor protección durante todo el proceso digestivo.

Las reacciones de transfosfatidilación se desarrollan en un medio bifásico, constituido por un tampón acuoso y un disolvente orgánico, inmiscibles entre sí, ya que es en la interfase generada, donde la FLD actúa. Además, de manera paralela, la FLD puede catalizar la reacción de hidrólisis de la FC, generando AF de manera no deseada. Según esto, se siguió la metodología descrita por Casado y col. [68], en la que se reemplazaba el uso de disolventes orgánicos volátiles por etil butirato, categorizado como GRAS.

En primer lugar, se amplió la selección de disolventes GRAS, ya que juegan un importante papel en la solubilidad de los sustratos y en el medio bifásico generado, factores

clave para el desarrollo de la reacción. Tras un primer análisis, se determinó que limoneno, etil butirato y etil isovalerato cumplían las condiciones adecuadas en términos de solubilidad y polaridad.

El estudio de la reacción de transfosfatidilación se llevó a cabo a 40 °C, de acuerdo con las especificaciones del biocatalizador, y se basó en la experimentación en torno a cuatro variables: concentración y relación molar de los sustratos, carga enzimática, presencia de iones Ca^{2+} y proporción volumétrica entre la fase acuosa y la fase orgánica.

Un primer estudio, reveló que, de manera generalizada, el uso de etil butirato como fase orgánica de la reacción conducía a una mayor conversión de la FC, sin embargo, en el producto de reacción, la proporción de AF era demasiado elevada. Para evitar la reacción de hidrólisis, la mejor alternativa entre los disolventes estudiados fue el limoneno. Otro dato relevante fue que, al contrario que en otros estudios [69, 145], las mejores tasas de conversión tuvieron lugar cuando la proporción de medio acuoso era superior a la fase orgánica. Pese a todo, el grado de conversión de la FC en ningún caso superó el 70%.

Anteponiendo como criterio de selección la ausencia de la reacción secundaria de hidrólisis, y valorando los resultados en su conjunto, se decidió proseguir con un estudio pormenorizado usando limoneno como fase orgánica de la reacción, en una proporción entre el disolvente y la fase acuosa 1:3 v:v. Para el resto de condiciones estudiadas, se decidió utilizar relaciones molares estequiométricas entre el batil alcohol y la FC, con el fin de evitar un exceso de alguno de los sustratos en el producto final de reacción, que complicaría el posterior proceso de purificación. A su vez, se decidió proseguir el estudio utilizando una carga enzimática del 10% (p/p) y una presencia de iones de Ca^{2+} de 67 mmol/L, en base a los resultados previos obtenidos.

A continuación, se analizó el curso de la reacción con el tiempo, donde se observó que a las 8 h, la reacción de hidrólisis alcanzaba un equilibrio, mientras que la transfosfatidilación seguía progresando. Esto podía estar debido a la baja tasa de solubilidad del batil alcohol en el limoneno, que también podría comprometer la productividad volumétrica del proceso. Por ello, se planteó aumentar la temperatura de reacción a 50 °C, aumentando así la solubilidad del batil alcohol en limoneno y confiriendo una mayor fluidez a las interfases de la emulsión generada, lo cual podría favorecer el desarrollo de la reacción.

De este modo, se alcanzó por primera vez la completa desaparición de FC. Con este resultado positivo, y con el fin de aumentar la viabilidad industrial del proceso, se decidió reajustar la carga enzimática, obteniendo los mismos resultados con un 5% (p/p) de biocatalizador. Además, se llevó a cabo un estudio de la productividad volumétrica en estas condiciones de reacción, alcanzando unos valores óptimos de conversión con una concentración de sustratos de 126 mmol/L, seis veces superior a las concentraciones utilizadas en el inicio del estudio.

Por último, estas condiciones de reacción se utilizaron para llevar a cabo la reacción a una escala diez veces superior, obteniéndose un producto final con un contenido superior al 70% de la nueva molécula sintetizada, con una composición final de 73% fosfatidilbatil alcohol, 15% AF, 9% batil alcohol y 3% FC, y un rendimiento del 87%.

4.3 Sugerencias para futuras investigaciones

Para mejorar la aplicabilidad industrial del proceso de glicerolisis enzimática del aceite de hígado de tiburón *quimera*, sería necesario aumentar la vida útil del biocatalizador, mediante el control minucioso de los compuestos de oxidación generados, así como su eliminación previa en el aceite de partida.

Con el fin de completar el estudio sobre el uso de AKGs como moléculas efectivas para el transporte de compuestos bioactivos, sería necesario llevar a cabo la inclusión de algún compuesto con baja bioaccesibilidad en los dos sistemas lipídicos desarrollados. Para ello, en primer lugar, debería evaluarse la efectividad de dicha inclusión, comprobando la carga y la eficiencia del compuesto bioactivo en el vehículo lipídico, así como la estabilidad de la mezcla. A continuación, se podría llevar a cabo un proceso digestivo *in vitro* que permitiese valorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la mezcla, evaluando la bioactividad de la fracción biodisponible sobre líneas celulares.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Respecto a los objetivos específicos (i), (ii) y (iii):

- 1.1. La lipasa *Candida antarctica* inmovilizada ha sido la más efectiva para el proceso de glicerolisis de aceite de hígado de tiburón *quimera*, debido a su mayor tasa de conversión de TAG y DAKG y a las ventajas económicas y de reutilización que ofrece la inmovilización.
- 1.2. El desarrollo de la glicerolisis enzimática de aceite de tiburón *quimera* en presencia del disolvente GRAS ciclopentanona ha mejorado la solubilidad del glicerol en el medio de reacción, aumentando la conversión de TAG y de DAKG.
- 1.3. Bajo condiciones óptimas de reacción: 40 °C, la lipasa de *Candida antarctica* como biocatalizador, relación molar RLO:glicerol = 1:1 y 67% (p/p) de ciclopentanona, la glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera* ha permitido la obtención de un sistema potencialmente auto-emulsionable, constituido por una mezcla de glicéridos menores y alquilglicerol con potencial bioactividad.
- 1.4. La glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera* ha mostrado ser un proceso fácilmente escalable a planta piloto. La reutilización de la lipasa de *Candida antarctica* en consecutivas reacciones de glicerolisis a escala planta piloto ha permitido producir una cantidad suficiente de producto de reacción para posteriores ensayos de bioactividad, así como estimar la vida media del biocatalizador en 145 h.
- 1.5. Mediante el uso de un modelo basado en el mecanismo de Michaelis-Menten, el estudio cinético de la reacción de glicerolisis de aceite de hígado de tiburón *quimera* en presencia de la lipasa de *Candida antarctica*, ha demostrado de manera numérica que la conversión de TAG es aproximadamente 1.5 veces más rápida que la de DAKG.
- 1.6. El producto obtenido a partir de la reacción de glicerolisis enzimática de aceite hígado de tiburón *quimera* ha mostrado tener un comportamiento cristalino a temperaturas de hasta 45 °C, debido a la presencia de la fracción de MAG generada.
- 1.7. La duración del tratamiento térmico efectuado sobre el producto obtenido a partir de la reacción de glicerolisis enzimática de aceite de hígado de tiburón *quimera* ha mostrado tener una influencia sobre su comportamiento cristalino, concretamente sobre sus cinéticas de cristalización y fusión, y sobre su estabilidad polimórfica.

2. Respecto al objetivo específico (iv):

- 2.1. La naturaleza química del nucleófilo utilizado en la reacción de transfosfatidilación requiere condiciones específicas de reacción en términos de temperatura, composición de las fases orgánica y acuosa y en la proporción de las mismas, para conseguir una máxima tasa de conversión y pureza, así como para minimizar la reacción de hidrólisis.
- 2.2. La reacción de transfosfatidilación enzimática de batil alcohol y FC catalizada por la FLD, ha resultado ser un método eficaz para la obtención de fosfatidilbatil alcohol. Este nuevo FL podría ser más bioaccesible que el batil alcohol de partida y, por tanto, presentar mayor bioactividad.

Como **CONCLUSIÓN GENERAL**, la presente Tesis Doctoral ha permitido el desarrollo y optimización de dos procesos enzimáticos en el marco de la *Química Verde* para la obtención de sendos sistemas lipídicos de vehiculización basados en AKGs con potenciales propiedades bioactivas. Estos nuevos sistemas están destinados a su uso en formulaciones para el transporte de compuestos con baja hidrosolubilidad y limitada bioactividad *in vivo*, para la mejora de su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y, por tanto, su bioeficacia. Estudios adicionales son necesarios para evaluar la eficacia de estos sistemas en el desarrollo de suplementos nutricionales, alimentos funcionales o nutracéuticos de alta bioaccesibilidad y bioactividad.

CONCLUSIONS

1. According to the specific objectives (i), (ii) y (iii):

- 1.1. Immobilized lipase *Candida antarctica* has shown to be the most effective biocatalyst for the glycerolysis of *ratfish* liver oil, due to the greatest DAKG and TAG conversion rates achieved, as well as to the economic advantages and the possibility of reutilization.
- 1.2. The utilization of GRAS solvent cyclopentanone for the glycerolysis of *ratfish* liver oil improved the solubility of glycerol in the reaction medium, resulting in greater conversion rates of TAG and DAKG.
- 1.3. Optimal reaction conditions, i.e. 40 °C, RLO to glycerol molar ratio of 1:1, use of immobilized lipase *Candida antarctica* as biocatalyst and 67% (w/w) of cyclopentanone, led to a system with potential self-emulsifying properties, composed of a mixture of acyl- and alkylglycerides, potentially bioactive.
- 1.4. Glycerolysis process under these conditions was easily scaled-up to pilot plant. Consecutive reutilization of lipase *Candida antarctica* in glycerolysis reactions at pilot plant scale allowed for obtaining enough amount of the product to be utilized in future bioactivity assays, as well as for estimating the half-life of the biocatalyst in 145 h.
- 1.5. A model derived from a generalized Michaelis-Menten mechanism was developed to describe the kinetics of glycerolysis of *ratfish* liver oil in the presence of lipase *Candida antarctica*, accurately determining that the conversion of TAG was 1.5 times faster compared to that of DAKG.
- 1.6. The product obtained from the enzymatic glycerolysis reaction of *ratfish* liver oil, showed crystalline behavior up to 45 °C, caused by the newly synthesized MAG.
- 1.7. Crystallization behavior and polymorphic stability of the product obtained from the enzymatic glycerolysis reaction of *ratfish* liver oil was influenced by the duration of the thermal pre-treatment utilized.

2. According to the specific objective (iv):

- 2.1. The chemical nature of the nucleophile utilized in transphosphatidylation reaction requires specific reaction conditions in terms of temperature, organic phase and aqueous phase compositions and proportions, to achieve optimum conversion and product purity, as well as minimizing the undesired hydrolysis reaction.
- 2.2. Enzymatic transphosphatidylation of batyl alcohol and phosphatidylcholine, in the presence of phospholipase D, has shown to be an efficient method to obtain phosphatidylbatil alcohol. This novel phospholipid might present a greater bioaccessibility compared to the non-modified batyl alcohol, resulting in a higher bioactivity.

As a **GENERAL CONCLUSION**, the present Doctoral Thesis has allowed the development and optimization of two enzymatic processes, under the basis of *Green Chemistry*, to obtain alkylglycerol-based delivery systems with potential bioactive properties. These novel systems are meant for its use in formulation for transportation of low hydrosolubility and limited *in vivo* bioactivity compounds, in order to improve their bioaccessibility and bioavailability, and therefore their bioefficacy. Further experiments will be necessary in order to evaluate the efficiency of these systems in the formulation of nutritional supplements, functional foods or nutraceuticals of high of bioaccessibility and bioactivity.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. Magnusson, C.D. and Haraldsson, G.G. *Ether lipids*. Chem. Phys. Lipids. **2011**. 164 (5), 315-340.
2. Iannitti, T. and Palmieri, B. *An update on the therapeutic role of alkylglycerols*. Mar. Drugs. **2010**. 8 (8), 2267-2300.
3. Hallgren, B. and Larsson, S. *The glyceryl ethers in man and cow*. J. Lipid Res. **1962**. 3 (1), 39-43.
4. Kayama, M. and Mankura, M. *Natural oleochemicals in marine fishes*. Int. News Fats, Oils Relat. Mater. **1998**. 9 (8), 794-799.
5. Hayashi, K. and Takagi, T. *Composition of Diacyl Glyceryl Ethers in the Liver Lipids of Ratfish, Hydrolagus novaezealandiae*. Nippon Suisan Gakkaishi. **1980**. 46 (7), 855-861.
6. Snyder, F. *The ether lipid trail: a historical perspective*. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids. **1999**. 1436 (3), 265-278.
7. Pedrono, F., Martin, B., Leduc, C., Le Lan, J., Saiag, B., Legrand, P., Moulinoux, J.-P., and Legrand, A.B. *Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice*. Nutr. Cancer. **2004**. 48 (1), 64-69.
8. Krotkiewski, M., Przybyszewska, M., and Janik, P. *Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer)*. Med. Sci. Monit. **2003**. 9 (11), PI131-135.
9. Hallgren, B., *Therapeutic effects of ether lipids*, in Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects, Ed. H.K. Mangold, Paltauf, F. **1983**. Academic Press: New York. 261-275.
10. Joelsson, I. *Effect of Alkylglycerols on the Frequency of Fistulas Following Radiation Therapy*. Lipidforum: Lund, Sweden. **1988**, 1-7.
11. Iagher, F., de Brito Belo, S.R., Souza, W.M., Nunes, J.R., Naliwaiko, K., Sasaki, G.L., Bonatto, S.J.R., de Oliveira, H.H.P., Brito, G.A.P., and de Lima, C. *Antitumor and anticachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats*. Lipids Health Dis. **2013**. 12 (1), 146.
12. Iagher, F., de Brito Belo, S.R., Naliwaiko, K., Franzói, A.M., de Brito, G.A.P., Yamazaki, R.K., Muritiba, A.L., Muehlmann, L.A., Steffani, J.A., and Fernandes, L.C. *Chronic Supplementation With Shark Liver Oil for Reducing Tumor Growth and Cachexia in Walker 256 Tumor-Bearing Rats*. Nutr. Cancer. **2011**. 63 (8), 1307-1315.
13. Acevedo, R., Gil, D., del Campo, J., Bracho, G., Valdés, Y., and Pérez, O. *The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols*. Vaccine. **2006**. 24, S32-S33.
14. Kantah, M.-K., Wakasugi, H., and Kumari, A. *Intestinal immune-potential by a purified alkylglycerols compound*. Acta Bio Med. Atenei Parmensis. **2012**. 83 (1), 36-43.
15. Qian, L., Zhang, M., Wu, S., Zhong, Y., Van Tol, E., and Cai, W. *Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes*. PLoS One. **2014**. 9 (4), e96207.

16. Tchórzewski, H., Banasik, M., Głowacka, E., and Lewkowicz, P. *Modification of innate immunity in humans by active components of shark liver oil*. Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego. **2002**. 13 (76), 329-332.
17. Palmieri, B., Pennelli, A., and Di Cerbo, A. *Jurassic surgery and immunity enhancement by alkylglycerols of shark liver oil*. Lipids Health Dis. **2014**. 13 (1), 178.
18. Mitre, R., Etienne, M., Martinais, S., Salmon, H., Allaume, P., Legrand, P., and Legrand, A.B. *Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation*. Br. J. Nutr. **2005**. 94 (5), 753-762.
19. Oh, S.Y. and Jadhav, L.S. *Effects of dietary alkylglycerols in lactating rats on immune responses in pups*. Pediatr. Res. **1994**. 36 (3), 300-305.
20. Erdlenbruch, B., Alipour, M., Fricker, G., Miller, D.S., Kugler, W., Eibl, H., and Lakomek, M. *Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries*. Br. J. Pharmacol. **2003**. 140 (7), 1201-1210.
21. Erdlenbruch, B., Schinkhof, C., Kugler, W., Heinemann, D.E., Herms, J., Eibl, H., and Lakomek, M. *Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain*. Br. J. Pharmacol. **2003**. 139 (4), 685-694.
22. Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Eibl, H., and Lakomek, M. *Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats*. Exp. Brain Res. **2000**. 135 (3), 417-422.
23. Hülper, P., Dullin, C., Kugler, W., Lakomek, M., and Erdlenbruch, B. *Monitoring proteins using in vivo near-infrared time-domain optical imaging after 2-O-hexyldiglycerol-mediated transfer to the brain*. Mol. Imaging Biol. **2011**. 13 (2), 275-283.
24. Hülper, P., Veszelka, S., Walter, F., Wolburg, H., Fallier-Becker, P., Piontek, J., Blasig, I., Lakomek, M., Kugler, W., and Deli, M. *Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells*. Br. J. Pharmacol. **2013**. 169 (7), 1561-1573.
25. Zhang, M., Sun, S., Tang, N., Cai, W., and Qian, L. *Oral administration of alkylglycerols differentially modulates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice*. Evid. Based Complement. Alternat. Med. **2013**. 2013.
26. Parri, A., Fitó, M., Torres, C., Muñoz-Aguayo, D., Schröder, H., Cano, J., Vázquez, L., Reglero, G., and Covas, M.-I. *Alkylglycerols reduce serum complement and plasma vascular endothelial growth factor in obese individuals*. Inflammopharmacology. **2016**. 24 (2-3), 127-131.
27. Cheminade, C., Gautier, V., Hichami, A., Allaume, P., Le Lannou, D., and B. Legrand, A. *1-O-alkylglycerols improve boar sperm motility and fertility*. Biol. Reprod. **2002**. 66 (2), 421-428.
28. Mitre, R., Cheminade, C., Allaume, P., Legrand, P., and Legrand, A.B. *Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm*. Theriogenology. **2004**. 62 (8), 1557-1566.

29. Hammond, J.L., Koontz, D.L., Bazmi, H.Z., Beadle, J.R., Hostetler, S.E., Kini, G.D., Aldern, K.A., Richman, D.D., Hostetler, K.Y., and Mellors, J.W. *Alkylglycerol prodrugs of phosphonoformate are potent in vitro inhibitors of nucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 and select for resistance mutations that suppress zidovudine resistance*. Antimicrob. Agents Chemother. **2001**. 45 (6), 1621-1628.
30. Hostetler, K.Y. and Mellors, J.W. *Treatment of drug-resistant human immunodeficiency virus infection*. **2001**. University of California University of Pittsburgh US20030207843A1.
31. Haynes, M., Buckley, H.R., Higgins, M.L., and Pieringer, R.A. *Synergism between the antifungal agents amphotericin B and alkyl glycerol ethers*. Antimicrob. Agents Chemother. **1994**. 38 (7), 1523-1529.
32. Bergan, J., Skotland, T., Lingelem, A.B.D., Simm, R., Spilsberg, B., Lindbäck, T., Sylvänne, T., Simolin, H., Ekroos, K., and Sandvig, K. *The ether lipid precursor hexadecylglycerol protects against Shiga toxins*. Cell. Mol. Life Sci. **2014**. 71 (21), 4285-4300.
33. Martín, D., Morán-Valero, M.I., Señoráns, F.J., Reglero, G., and Torres, C.F. *In vitro intestinal bioaccessibility of alkylglycerols versus triacylglycerols as vehicles of butyric acid*. Lipids. **2011**. 46 (3), 277-285.
34. Sato, T., Seo, H.-S., Endo, Y., and Fujimoto, K. *Diacyl glyceryl ether as the major muscle lipid in Stromateus stellatus and its hydrolyzability by lipase and oral acute toxicity on mice*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **2002**.
35. Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., and Vadhanam, M.V. *Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems*. Cancer Lett. **2013**. 334 (1), 133-141.
36. Chillemi, R., Sciuto, S., Spatafora, C., and Tringali, C., *Hydroxytyrosol Lipophilic Analogues: Synthesis, Radical Scavenging Activity and Human Cell Oxidative Damage Protection*, in Olives and olive oil in health and disease prevention, Ed. V.R. Preedy and R.R. Watson. **2010**. Academic press: San Diego. 1233-1243.
37. Liu, Y. and Feng, N. *Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM)*. Adv. Colloid Interface Sci. **2015**. 221, 60-76.
38. Lawrence, X.Y., Amidon, G.L., Polli, J.E., Zhao, H., Mehta, M.U., Conner, D.P., Shah, V.P., Lesko, L.J., Chen, M.-L., and Lee, V.H. *Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions*. Pharm. Res. **2002**. 19 (7), 921-925.
39. Kohli, K., Chopra, S., Dhar, D., Arora, S., and Khar, R.K. *Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability*. Drug Discovery Today. **2010**. 15 (21), 958-965.
40. Torres, C.F., Martín, D., Torrelo, G., Casado, V., Fernández, O., Tenllado, D., Vázquez, L., Moran-Valero, M.I., and Reglero, G. *Lipids as delivery systems to improve the biological activity of bioactive ingredients*. Curr. Nutr. Food Sci. **2011**. 7 (3), 160-169.
41. Akoh, C. and Kim, B., *Structured Lipids*, in Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Ed. C.C. Akoh and D.B. Min. **2008**. CRC Press: New York. 841-872.

42. Maurelli, S., Blasi, F., Cossignani, L., Bosi, A., Simonetti, M.S., and Damiani, P. *Enzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing CLA isomers starting from sn-1, 3-diacylglycerols*. J. Am. Oil Chem. Soc. **2009**. 86 (2), 127-133.
43. del Mar Muño, M., Robles, A., Esteban, L., González, P.A., and Molina, E. *Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols*. Process Biochem. **2009**. 44 (7), 723-730.
44. Halldorsson, A., Magnusson, C.D., and Haraldsson, G.G. *Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols*. Tetrahedron Lett. **2001**. 42 (43), 7675-7677.
45. Reddy, K.K., Shanker, K.S., Ravinder, T., Prasad, R.B.N., and Kanjilal, S. *Chemoenzymatic synthesis and evaluation of novel structured phenolic lipids as potential lipophilic antioxidants*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **2010**. 112 (5), 600-608.
46. Naalsund, T., Malterud, K.E., Partali, V., and Sliwka, H.R. *Synthesis of a triantioxidant compound: combination of β -apo-8'-carotenoic acid, selenacapyloic acid and trolox in a triglyceride*. Chem. Phys. Lipids. **2001**. 112 (1), 59-65.
47. Sun, S. and Hu, B. *Enzymatic preparation of novel caffeoyl structured lipids using monoacylglycerols as caffeoyl acceptor and transesterification mechanism*. Biochem. Eng. J. **2017**. 124, 78-87.
48. Torres, C.F., Vazquez, L., Señoráns, F.J., and Reglero, G. *An efficient methodology for the preparation of alkoxyglycerols rich in conjugated linoleic acid and eicosapentaenoic acid*. J. Am. Oil Chem. Soc. **2007**. 84 (5), 443-448.
49. Ocaña, A., Torres, C., Gómez-Asensio, C., Arranz-Gutiérrez, E., Señoráns, F.J., and Reglero, G. *In vitro study of the effect of diesterified alkoxyglycerols with conjugated linoleic acid on adipocyte inflammatory mediators*. Lipids Health Dis. **2010**. 9 (1), 36.
50. Torres, C.F., Vázquez, L., Señoráns, F.J., and Reglero, G. *Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: A kinetic study*. Process Biochem. **2009**. 44 (9), 1025-1031.
51. Molina, S., Moran-Valero, M., Martín, D., Vazquez, L., Vargas, T., Torres, C., De Molina, A.R., and Reglero, G. *Antiproliferative effect of alkylglycerols as vehicles of butyric acid on colon cancer cells*. Chem. Phys. Lipids. **2013**. 175, 50-56.
52. Madrona, A., Pereira-Caro, G., Mateos, R., Rodríguez, G., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., and Espartero, J.L. *Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters*. Molecules. **2009**. 14 (5), 1762-1772.
53. Pereira-Caro, G., Mateos, R., Saha, S., Madrona, A., Espartero, J.L., Bravo, L., and Kroon, P.A. *Transepithelial transport and metabolism of new lipophilic ether derivatives of hydroxytyrosol by enterocyte-like Caco-2/TC7 cells*. J. Agric. Food. Chem. **2010**. 58 (21), 11501-11509.
54. Borgström, B., *Fat digestion and absorption*, in Intestinal Absorption, Ed. D.H. Smyth. **1974**. Springer: Boston, MA. 555-620.
55. Haraldsson, G.G. and Thorarensen, A. *Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase*. J. Am. Oil Chem. Soc. **1999**. 76 (10), 1143-1149.

56. Chojnacka, A., Gładkowski, W., Kielbowicz, G., and Wawrzęńczyk, C. *Enzymatic enrichment of egg-yolk phosphatidylcholine with α -linolenic acid*. Biotechnol. Lett. **2009**. 31 (5), 705-709.
57. Park, C.W., Kwon, S.J., Han, J.J., and Rhee, J.S. *Transesterification of phosphatidylcholine with eicosapentaenoic acid ethyl ester using phospholipase A2 in organic solvent*. Biotechnol. Lett. **2000**. 22 (2), 147-150.
58. Calviello, G., Palozza, P., Piccioni, E., Maggiano, N., Frattucci, A., Franceschelli, P., and Bartoli, G.M. *Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis*. Int. J. Cancer. **1998**. 75 (5), 699-705.
59. Harris, W.S. *Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review*. J. Lipid Res. **1989**. 30 (6), 785-807.
60. Magret, V., Elkhajil, L., Nazih-Sanderson, F., Martin, F., Bourre, J.-M., Fruchart, J.-C., and Delbart, C. *Entry of polyunsaturated fatty acids into the brain: evidence that high-density lipoprotein-induced methylation of phosphatidylethanolamine and phospholipase A2 are involved*. Biochem. J. **1996**. 316 (3), 805-811.
61. Kaki, S.S. and Adlercreutz, P. *Lipase-catalyzed synthesis and characterization of 1-butanoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine, a potential lipidic prodrug of butyric acid*. Chem. Phys. Lipids. **2011**. 164 (3), 246-250.
62. Miyamoto, S., Koga, T., and Terao, J. *Synthesis of a novel phosphate ester of a vitamin E derivative and its antioxidative activity*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **1998**. 62 (12), 2463-2466.
63. Balakrishna, M., Kaki, S.S., Karuna, M.S., Sarada, S., Kumar, C.G., and Prasad, R. *Synthesis and in vitro antioxidant and antimicrobial studies of novel structured phosphatidylcholines with phenolic acids*. Food Chem. **2017**. 221, 664-672.
64. Gliszczyńska, A., Niezgoda, N., Gładkowski, W., Czarnecka, M., Świtalska, M., and Wietrzyk, J. *Synthesis and biological evaluation of novel phosphatidylcholine analogues containing monoterpene acids as potent antiproliferative agents*. PLoS One. **2016**. 11 (6), e0157278.
65. Servi, S., *Phospholipases as Synthetic Catalysts*, in Biocatalysis - From Discovery to Application, Ed. W.D. Fessner, et al. **1999**. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. 127-158.
66. Escribá, P.V., Busquets, X., Inokuchi, J.-i., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J.L., and Vigh, L. *Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment*. Prog. Lipid Res. **2015**. 59, 38-53.
67. Yamamoto, Y., Hosokawa, M., Kurihara, H., Maoka, T., and Miyashita, K. *Synthesis of phosphatidylated-monoterpene alcohols catalyzed by phospholipase D and their antiproliferative effects on human cancer cells*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2008**. 18 (14), 4044-4046.
68. Casado, V., Reglero, G., and Torres, C.F. *Production and Scale-up of phosphatidyl-tyrosol catalyzed by a food grade phospholipase D*. Food Bioprod. Process. **2013**. 91 (4), 599-608.

69. Casado, V., Reglero, G., and Torres, C.F. *Novel and efficient solid to solid transphosphatidylation of two phenylalkanols in a biphasic GRAS medium*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **2014**. 99, 14-19.
70. Martin, D., Garcia-Serrano, A., Casado, V., Vázquez, L., Reglero, G., and Torres, C.F. *Antioxidant activity of phosphatidyl derivatives of hydroxytyrosol in edible oils*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **2014**. 116 (8), 1035-1043.
71. Martin, D., Moran-Valero, M.I., Casado, V., Reglero, G., and Torres, C.F. *Phosphatidyl derivative of hydroxytyrosol. in vitro intestinal digestion, bioaccessibility, and its effect on antioxidant activity*. J. Agric. Food. Chem. **2014**. 62 (40), 9751-9759.
72. Nagao, A., Ishida, N., and Terao, J. *Synthesis of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid by phospholipase D*. Lipids. **1991**. 26 (5), 390-394.
73. Koga, T., Nagao, A., Terao, J., Sawada, K., and Mukai, K. *Synthesis of a phosphatidyl derivative of vitamin E and its antioxidant activity in phospholipid bilayers*. Lipids. **1994**. 29 (2), 83-89.
74. Koga, T. and Terao, J. *Antioxidant activity of a novel phosphatidyl derivative of vitamin E in lard and its model system*. J. Agric. Food. Chem. **1994**. 42 (6), 1291-1294.
75. Hidaka, N., Takami, M., and Suzuki, Y. *Enzymatic phosphatidylation of thiamin, pantothenic acid, and their derivatives*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). **2008**. 54 (3), 255-261.
76. Suzuki, Y., Doi, Y., and Uchida, K. *Phosphatidylation of pyridoxine and riboflavin by phospholipase D*. in *Abstracts (L-47) of European Symposium on Biocatalysis, Graz, Austria*. 1993.
77. de Pinedo, A.T., Penalver, P., Rondon, D., and Morales, J. *Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure*. Tetrahedron. **2005**. 61 (32), 7654-7660.
78. Meng, Q.-H., Lewis, P., Wähälä, K., Adlercreutz, H., and Tikkanen, M.J. *Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein*. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids. **1999**. 1438 (3), 369-376.
79. Chapado, L., Linares-Palomino, P.J., Salido, S., Altarejos, J., Rosado, J.A., and Salido, G.M. *Synthesis and evaluation of the platelet antiaggregant properties of phenolic antioxidants structurally related to rosmarinic acid*. Bioorg. Chem. **2010**. 38 (3), 108-114.
80. Kritchevsky, D. and Chen, S.C. *Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review*. Nutr. Res. **2005**. 25 (5), 413-428.
81. Demonty, I., Chan, Y.-M., Pelled, D., and Jones, P.J. *Fish-oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish-oil or sunflower oil esters of plant sterols*. Am. J. Clin. Nutr. **2006**. 84 (6), 1534-1542.
82. Torres, C.F., Torrelo, G., Vazquez, L., Señorans, F.J., and Reglero, G. *Stepwise esterification of phytosterols with conjugated linoleic acid catalyzed by Candida rugosa lipase in solvent-free medium*. J. Biosci. Bioeng. **2008**. 106 (6), 559-562.

83. Mouhid, L., Corzo-Martínez, M., Torres, C., Vázquez, L., Reglero, G., Fornari, T., and Ramírez de Molina, A. *Improving In Vivo Efficacy of Bioactive Molecules: An Overview of Potentially Antitumor Phytochemicals and Currently Available Lipid-Based Delivery Systems*. J. Oncol. **2017**, ID 7351976.
84. Kalepu, S., Manthina, M., and Padavala, V. *Oral lipid-based drug delivery systems—an overview*. Acta Pharm. Sin. B. **2013**. 3 (6), 361-372.
85. Shrestha, H., Bala, R., and Arora, S. *Lipid-based drug delivery systems*. J. Pharm. **2014**, ID 801820.
86. Feeney, O.M., Crum, M.F., McEvoy, C.L., Trevaskis, N.L., Williams, H.D., Pouton, C.W., Charman, W.N., Bergström, C.A., and Porter, C.J. *50years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives*. Adv. Drug Del. Rev. **2016**. 101, 167-194.
87. Metselaar, J.M. and Storm, G. *Liposomes in the treatment of inflammatory disorders*. Expert Opin. Drug Delivery. **2005**. 2 (3), 465-476.
88. Vemuri, S. and Rhodes, C.T. *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. Pharm. Acta Helv. **1995**. 70 (2), 95-111.
89. Dwivedi, C., Sahu, R., Tiwari, S.P., Satapathy, T., and Roy, A. *Role of liposome in novel drug delivery system*. J. Drug Delivery Ther. **2014**. 4 (2), 116-129.
90. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S.Y., Sood, A.K., and Hua, S. *Advances and challenges of liposome assisted drug delivery*. Front. Pharmacol. **2015**. 6, 286.
91. Yingchoncharoen, P., Kalinowski, D.S., and Richardson, D.R. *Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come*. Pharmacol. Rev. **2016**. 68 (3), 701-787.
92. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A., and Ciccolini, J. *Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept*. ISRN pharmaceutics. **2012**, ID 738432.
93. Kaur, G., Garg, T., Rath, G., and Goyal, A.K. *Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery*. Drug Deliv. **2016**. 23 (7), 2497-2512.
94. Benvegnu, T., Réthoré, G., Brard, M., Richter, W., and Plusquellec, D. *Archaeosomes based on novel synthetic tetraether-type lipids for the development of oral delivery systems*. Chem. Commun. **2005** (44), 5536-5538.
95. Sharma, R.A., McLelland, H.R., Hill, K.A., Ireson, C.R., Euden, S.A., Manson, M.M., Pirmohamed, M., Marnett, L.J., Gescher, A.J., and Steward, W.P. *Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer*. Clin. Cancer Res. **2001**. 7 (7), 1894-1900.
96. Fricker, G., Kromp, T., Wendel, A., Blume, A., Zirkel, J., Rebmann, H., Setzer, C., Quinkert, R.-O., Martin, F., and Müller-Goymann, C. *Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery*. Pharm. Res. **2010**. 27 (8), 1469-1486.
97. Awasthi, R., Kulkarni, G., and Pawar, V.K. *Phytosomes: an approach to increase the bioavailability of plant extracts*. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. **2011**. 3 (2), 1-3.

98. Das, S. and Chaudhury, A. *Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery*. AAPS PharmSciTech. **2011**. 12 (1), 62-76.
99. Pardeshi, C., Rajput, P., Belgamwar, V., Tekade, A., Patil, G., Chaudhary, K., and Sonje, A. *Solid lipid based nanocarriers: An overview/Nanonosači na bazi čvrstih lipida: Pregled*. Acta Pharmaceutica. **2012**. 62 (4), 433-472.
100. Das, S., Ng, W.K., and Tan, R.B. *Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?* Eur. J. Pharm. Sci. **2012**. 47 (1), 139-151.
101. Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., and Espuelas, S. *Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics*. Vet. Parasitol. **2011**. 180 (1), 47-71.
102. Estanqueiro, M., Amaral, M.H., Conceição, J., and Lobo, J.M.S. *Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art*. Colloids Surf. B. Biointerfaces. **2015**. 126, 631-648.
103. Müller, R.H., Radtke, M., and Wissing, S.A. *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. Adv. Drug Del. Rev. **2002**. 54, S131-S155.
104. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. *Formation and stability of nano-emulsions*. Adv. Colloid Interface Sci. **2004**. 108, 303-318.
105. Acosta, E. *Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery*. Current opinion in colloid & interface science. **2009**. 14 (1), 3-15.
106. Heuschkel, S., Goebel, A., and Neubert, R.H. *Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery*. J. Pharm. Sci. **2008**. 97 (2), 603-631.
107. Tang, T.-T., Hu, X.-B., Liao, D.-H., Liu, X.-Y., and Xiang, D.-X. *Mechanisms of microemulsion enhancing the oral bioavailability of puerarin: comparison between oil-in-water and water-in-oil microemulsions using the single-pass intestinal perfusion method and a chylomicron flow blocking approach*. International journal of nanomedicine. **2013**. 8, 4415.
108. McClements, D.J. *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities*. Soft matter. **2012**. 8 (6), 1719-1729.
109. Rabinow, B.E. *Nanosuspensions in drug delivery*. Nat. Rev. Drug Discov. **2004**. 3 (9), 785-796.
110. Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., and Zhang, D. *Stability of nanosuspensions in drug delivery*. J. Controlled Release. **2013**. 172 (3), 1126-1141.
111. Wang, L., Du, J., Zhou, Y., and Wang, Y. *Safety of nanosuspensions in drug delivery*. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. **2017**. 13 (2), 455-469.
112. Ghosh, I., Schenck, D., Bose, S., and Ruegger, C. *Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: effect of vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption*. Eur. J. Pharm. Sci. **2012**. 47 (4), 718-728.

113. Pouton, C.W. *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems*. Eur. J. Pharm. Sci. **2000**. 11, S93-S98.
114. Pouton, C.W. *Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system*. Eur. J. Pharm. Sci. **2006**. 29 (3), 278-287.
115. Porter, C.J., Pouton, C.W., Cuine, J.F., and Charman, W.N. *Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems*. Adv. Drug Del. Rev. **2008**. 60 (6), 673-691.
116. Pouton, C.W. and Porter, C.J. *Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies*. Adv. Drug Del. Rev. **2008**. 60 (6), 625-637.
117. Gershanik, T. and Benita, S. *Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs*. Eur. J. Pharm. Biopharm. **2000**. 50 (1), 179-188.
118. Chengaiah, B., Alagusundaram, M., Ramkanth, S., and Chetty, C.M. *Self emulsifying drug delivery system: a novel approach for drug delivery*. Res. J. Pharm. Technol. **2011**. 4 (2), 175-181.
119. Dokania, S. and Joshi, A.K. *Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)–challenges and road ahead*. Drug Deliv. **2015**. 22 (6), 675-690.
120. Gupta, S., Kesarla, R., and Omri, A. *Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems*. ISRN pharmaceutics. **2013**. 2013.
121. Gonçalves, A., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Estevinho, B.N., Rocha, F., Greiner, R., and McClements, D.J. *Production, properties, and applications of solid self-emulsifying delivery systems (S-SEDS) in the food and pharmaceutical industries*. Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects. **2017**.
122. Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Yeap, Y.Y., Anby, M.U., Pouton, C.W., and Porter, C.J. *Lipid-based formulations and drug supersaturation: harnessing the unique benefits of the lipid digestion/absorption pathway*. Pharm. Res. **2013**. 30 (12), 2976-2992.
123. Anastas, P.T. and Kirchhoff, M.M. *Origins, current status, and future challenges of green chemistry*. Acc. Chem. Res. **2002**. 35 (9), 686-694.
124. Bommarius, A.S. and Riebel-Bommarius, B.R., *Biocatalysis: fundamentals and applications*. **2004**. John Wiley & Sons.
125. Arroyo, M., Acebal, C., and de la Mata, I. *Biocatalysis and Biotechnology*. Arbor: Ciencia, Pensamiento y Cultura. **2014**. 190 (768).
126. Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H.B., and Bejar, S. *Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes*. Crit. Rev. Biotechnol. **2016**. 36 (2), 246-258.
127. Klibanov, A.M. *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature. **2001**. 409 (6817), 241-246.

128. Tobiszewski, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., Namieśnik, J., and Pena-Pereira, F. *A solvent selection guide based on chemometrics and multicriteria decision analysis*. Green Chem. **2015**. 17 (10), 4773-4785.
129. Sheldon, R.A. *Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art*. Green Chem. **2005**. 7 (5), 267-278.
130. Alonso, D.A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I.M., and Ramón, D.J. *Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century*. Eur. J. Org. Chem. **2016**. 2016 (4), 612-632.
131. Bornscheuer, U.T. *Enzymes in lipid modification: Past achievements and current trends*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **2014**. 116 (10), 1322-1331.
132. Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., and Papamichael, E.M. *Advances in lipase-catalyzed esterification reactions*. Biotechnol. Adv. **2013**. 31 (8), 1846-1859.
133. Willis, W.M. and Marangoni, A.G., *Enzymatic Esterification*, in Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Ed. C.C. Akoh and D.B. Min. **2008**. CRC Press: New York. 807-840.
134. Jennings, B.H. and Akoh, C.C. *Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **1999**. 76 (10), 1133-1137.
135. Foglia, T.A., Petruso, K., and Fearheller, S.H. *Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures*. Journal of the American Oil Chemists' Society. **1993**. 70 (3), 281-285.
136. Stamenković, O.S., Veličković, A.V., and Veljković, V.B. *The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives*. Fuel. **2011**. 90 (11), 3141-3155.
137. Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Sara, M., Sanz, M.T., and Carballido, J.R. *Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review*. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. **2010**. 11 (1), 1-12.
138. Feltes, M.M.C., de Oliveira, D., Block, J.M., and Ninow, J.L. *The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest*. Food Bioprocess Technol. **2013**. 6 (1), 17-35.
139. Pawongrat, R., Xu, X., and Aran, H. *Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK*. Food Chem. **2007**. 104 (1), 251-258.
140. Torres, C., Lin, B., and Hill, C.G. *Lipase-catalyzed glycerolysis of an oil rich in eicosapentaenoic acid residues*. Biotechnol. Lett. **2002**. 24 (9), 667-673.
141. Fernández, Ó., Vázquez, L., Reglero, G., and Torres, C.F. *Discrimination against diacylglycerol ethers in lipase-catalysed ethanolysis of shark liver oil*. Food Chem. **2013**. 136 (2), 464-471.

142. Song, J.K., Han, J.J., and Rhee, J.S. *Phospholipases: Occurrence and production in microorganisms, assay for high-throughput screening, and gene discovery from natural and man-made diversity*. J. Am. Oil Chem. Soc. **2005**. 82 (10), 691-705.
143. Casado, V., Martín, D., Torres, C., and Reglero, G., *Phospholipases in Food Industry: A Review*, in Lipases and phospholipases: methods and protocols, Ed. G. Sandoval. **2012**. Humana Press: New York. 495-524.
144. Dayton, C.L.G., Rosswurm, E.M., and Da Silva Galhardo, F. *Enzymatic degumming utilizing a mixture of pla and plc phospholipases*. **2014**. Google Patents. US8956853B2.
145. Yamamoto, Y., Kurihara, H., Miyashita, K., and Hosokawa, M. *Synthesis of novel phospholipids that bind phenylalkanols and hydroquinone via phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation*. New biotechnology. **2011**. 28 (1), 1-6.
146. Ulbrich-Hofmann, R., *Phospholipases Used in Lipid Transformations*, in Enzymes in Lipid Modification, Ed. U.T. Bornscheuer. **2005**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 217-262.
147. Duan, Z.-Q. and Hu, F. *Efficient synthesis of phosphatidylserine in 2-methyltetrahydrofuran*. J. Biotechnol. **2013**. 163 (1), 45-49.
148. Duan, Z.-Q. and Hu, F. *Highly efficient synthesis of phosphatidylserine in the eco-friendly solvent γ -valerolactone*. Green Chem. **2012**. 14 (6), 1581-1583.
149. D'Arrigo, P., Cerioli, L., Chiappe, C., Panzeri, W., Tessaro, D., and Mele, A. *Improvements in the enzymatic synthesis of phosphatidylserine employing ionic liquids*. J. Mol. Catal. B: Enzym. **2012**. 84, 132-135.
150. Pollard, D.J. and Woodley, J.M. *Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now*. Trends Biotechnol. **2007**. 25 (2), 66-73.
151. Grunwald, P., *Preparation and application of immobilized phospholipases*, in Enzymes in Lipid Modification, Ed. U.T. Bornscheuer. **2000**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. 263-291.
152. Woodley, J.M., Bisschops, M., Straathof, A.J., and Ottens, M. *Future directions for in-situ product removal (ISPR)*. J. Chem. Technol. Biotechnol. **2008**. 83 (2), 121-123.
153. Torres, C.F., Toré, A.M., Fornari, T., Señoráns, F.J., and Reglero, G. *Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study*. Biochem. Eng. J. **2007**. 34 (2), 165-171.
154. Pessoa, F.L.P., Magalhães, S.P., and de Carvalho Falcão, P.W. *Production of Biodiesel via Enzymatic Ethanolysis of the Sunflower and Soybean Oils: Modeling*. Appl. Biochem. Biotechnol. **2010**. 161 (1), 238-244.
155. Pacheco, C., Crapiste, G.H., and Carrín, M.E. *Lipase-catalyzed acidolysis of sunflower oil: Kinetic behavior*. J. Food Eng. **2010**. 98 (4), 492-497.
156. Palla, C.A. and Carrín, M.E. *Kinetics modeling of the acidolysis with immobilized Rhizomucor miehei lipases for production of structured lipids from sunflower oil*. Biochem. Eng. J. **2014**. 90, 184-194.

157. Ray, J., Nagy, Z.K., Smith, K.W., Bhaggan, K., and Stapley, A.G.F. *Kinetic study of the acidolysis of high oleic sunflower oil with stearic–palmitic acid mixtures catalysed by immobilised Rhizopus oryzae lipase*. *Biochem. Eng. J.* **2013**. 73, 17-28.
158. Vázquez, L., Fernandez, O., Blanco, R.M., Señoráns, F.J., Reglero, G., and Torres, C.F. *A kinetic study of the lipase-catalyzed ethanolysis of two short-chain triacylglycerols: Alkylglycerols vs. triacylglycerols*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**. 64 (1), 101-106.
159. Moquin, P.H.L., Temelli, F., Sovová, H., and Saldaña, M.D.A. *Kinetic modeling of glycerolysis–hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide media using equilibrium data*. *J. Supercrit. Fluids.* **2006**. 37 (3), 417-424.
160. Fiametti, K.G., Sychoski, M.M., Cesaro, A.D., Furigo, A., Bretanha, L.C., Pereira, C.M.P., Treichel, H., Oliveira, D.d., and Oliveira, J.V. *Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil*. *Ultrason. Sonochem.* **2011**. 18 (5), 981-987.
161. Voll, F., Krüger, R.L., de Castilhos, F., Filho, L.C., Cabral, V., Ninow, J., and Corazza, M.L. *Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil*. *Biochem. Eng. J.* **2011**. 56 (3), 107-115.
162. Valério, A., Krüger, R.L., Ninow, J., Corazza, F.C., de Oliveira, D.b., Oliveira, J.V., and Corazza, M.L. *Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in surfactant system*. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**. 57 (18), 8350-8356.
163. Cheirsilp, B., Kaewthong, W., and H-Kittikun, A. *Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase*. *Biochem. Eng. J.* **2007**. 35 (1), 71-80.
164. Solaesa, Á.G., Sanz, M.T., Beltrán, S., and Melgosa, R. *Kinetic study and kinetic parameters of lipase-catalyzed glycerolysis of sardine oil in a homogeneous medium*. *Chinese Journal of Catalysis.* **2016**. 37 (4), 596-606.
165. Marangoni, A.G., *Structure-function analysis of edible fats*. **2012**. AOCS Press Urbana.
166. Saitou, K., Mitsui, Y., Shimizu, M., Kudo, N., Katsuragi, Y., and Sato, K. *Crystallization behavior of diacylglycerol-rich oils produced from rapeseed oil*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**. 89 (7), 1231-1239.
167. Zabara, A. and Mezzenga, R. *Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases*. *J. Controlled Release.* **2014**. 188, 31-43.
168. Tang, D. and Marangoni, A.G. *Quantitative study on the microstructure of colloidal fat crystal networks and fractal dimensions*. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**. 128, 257-265.
169. Acevedo, N.C. and Marangoni, A.G. *Characterization of the nanoscale in triacylglycerol crystal networks*. *Crystal growth & design.* **2010**. 10 (8), 3327-3333.
170. Sato, K. *Crystallization behaviour of fats and lipids—a review*. *Chem. Eng. Sci.* **2001**. 56 (7), 2255-2265.
171. Rogers, M.A., Tang, D., Ahmadi, L., and Marangoni, A.G., *Fat crystal networks*, in *Food Materials Science*, Ed. J.M. Aguilera and P.J. Lillford. **2008**: New York, NY. 369-414.

172. Hou, D., Xie, C., Huang, K., and Zhu, C. *The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs)*. *Biomaterials*. **2003**. 24 (10), 1781-1785.
173. Gomes, G.V., Simplicio, I.A., Souto, E.B., Cardoso, L.P., and Pinho, S.C. *Development of a Lipid Particle for [Beta]-Carotene Encapsulation Using a Blend of Tristearin and Sunflower Oil: Choice of Lipid Matrix and Evaluation of Shelf Life of Dispersions*. *Food Technol. Biotechnol.* **2013**. 51 (3), 383.
174. Nik, A.M., Langmaid, S., and Wright, A.J. *Digestibility and β -carotene release from lipid nanodispersions depend on dispersed phase crystallinity and interfacial properties*. *Food Funct.* **2012**. 3 (3), 234-245.
175. Krog, N., *Crystallization properties and lyotropic phase behavior of food emulsifiers*, in *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*, Ed. N. Garti and K. Sato. **2001**. Taylor & Francis, London, UK: New York, NY. 505-526.
176. Vereecken, J., Meeussen, W., Foubert, I., Lesaffer, A., Wouters, J., and Dewettinck, K. *Comparing the crystallization and polymorphic behaviour of saturated and unsaturated monoglycerides*. *Food Res. Int.* **2009**. 42 (10), 1415-1425.
177. Bailey, A.E., *Melting and solidification of fats*, ed. A.E. Bailey. **1950**. New York, NY Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. 650-650.
178. Alfutimie, A., Curtis, R., and Tiddy, G.J. *Gel phase ($L\beta$) formation by mixed saturated and unsaturated monoglycerides*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*. **2014**. 456, 286-295.
179. Alfutimie, A., Al-Janabi, N., Curtis, R., and Tiddy, G.J. *The Effect of monoglycerides on the crystallisation of triglyceride*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*. **2016**. 494, 170-179.
180. Fredrick, E., Foubert, I., De Sype, J.V., and Dewettinck, K. *Influence of monoglycerides on the crystallization behavior of palm oil*. *Cryst. Growth Des.* **2008**. 8 (6), 1833-1839.
181. Chen, C., Van Damme, I., and Terentjev, E. *Phase behavior of C18 monoglyceride in hydrophobic solutions*. *Soft Matter*. **2009**. 5 (2), 432-439.
182. Chen, C. and Terentjev, E. *Aging and metastability of monoglycerides in hydrophobic solutions*. *Langmuir*. **2009**. 25 (12), 6717-6724.
183. Rogers, M.A. *Novel structuring strategies for unsaturated fats—Meeting the zero-trans, zero-saturated fat challenge: A review*. *Food Res. Int.* **2009**. 42 (7), 747-753.
184. López-Martínez, A., Morales-Rueda, J., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M., Marangoni, A., and Toro-Vazquez, J. *Comparing the crystallization and rheological behavior of organogels developed by pure and commercial monoglycerides in vegetable oil*. *Food Res. Int.* **2014**. 64, 946-957.
185. Chen, C.H. and Terentjev, E.M. *Colloid–monoglyceride composites in hydrophobic solutions*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*. **2011**. 384 (1), 536-542.
186. Verstringe, S., Moens, K., De Clercq, N., and Dewettinck, K. *Crystallization behavior of monoacylglycerols in a hydrophobic and a hydrophilic solvent*. *Food Res. Int.* **2015**. 67, 25-34.

187. Chen, Y., Ma, P., and Gui, S. *Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems*. BioMed research international. **2014**. 2014.
188. Cherezov, V., Clogston, J., Papiz, M.Z., and Caffrey, M. *Room to Move: Crystallizing Membrane Proteins in Swollen Lipidic Mesophases*. J. Mol. Biol. **2006**. 357 (5), 1605-1618.
189. Milak, S. and Zimmer, A. *Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems*. Int. J. Pharm. **2015**. 478 (2), 569-587.
190. Phan, S., Fong, W.-K., Kirby, N., Hanley, T., and Boyd, B.J. *Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release*. Int. J. Pharm. **2011**. 421 (1), 176-182.
191. Guo, C., Wang, J., Cao, F., Lee, R.J., and Zhai, G. *Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery*. Drug Discovery Today. **2010**. 15 (23), 1032-1040.
192. Yaghmur, A., De Campo, L., Sagalowicz, L., Leser, M.E., and Glatter, O. *Emulsified microemulsions and oil-containing liquid crystalline phases*. Langmuir. **2005**. 21 (2), 569-577.
193. Barauskas, J., Švedaitė, I., Butkus, E., Razumas, V., Larsson, K., and Tiberg, F. *Synthesis and aqueous phase behavior of 1-glycerol monooleyl ether*. Colloids Surf. B. Biointerfaces. **2005**. 41 (1), 49-53.
194. Peyronel, F. and Campos, R., *Methods used in the study of the physical properties of fats*, in Structure–function analysis of edible fats, Ed. A.G. Marangoni. **2012**. AOCS Press: Urbana, IL. 262-277.
195. Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M., and Woodley, J.M. *Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes*. Org. Process Res. Dev. **2010**. 15 (1), 266-274.
196. Malcata, F.X., Hill, C.G., and Amundson, C.H. *Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part III. Multiresponse kinetic studies*. Biotechnol. Bioeng. **1992**. 39 (10), 1002-1012.
197. Torres, C.F., Moeljadi, M., and Hill, C.G. *Lipase-catalyzed ethanolysis of fish oils: Multi-response kinetics*. Biotechnol. Bioeng. **2003**. 83 (3), 274-281.
198. Lessard, L.P. and Hill, C.G. *Effect of pH on the production of lipolyzed butter oil by a calf pregastric esterase immobilized in a hollow-fiber reactor: I. Uniresponse kinetics*. Biotechnol. Bioeng. **2000**. 69 (2), 183-195.
199. Pirozzi, D. *Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **2003**. 105 (10), 608-613.
200. Wang, Y. and Gordon, M.H. *Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase*. J. Agric. Food. Chem. **1991**. 39 (9), 1693-1695.
201. Tolstorebrov, I., Eikevik, T., and Bantle, M. *A DSC determination of phase transitions and liquid fraction in fish oils and mixtures of triacylglycerides*. Food Res. Int. **2014**. 58, 132-140.

202. Nik, A.M., Langmaid, S., and Wright, A.J. *Nonionic surfactant and interfacial structure impact crystallinity and stability of β -carotene loaded lipid nanodispersions*. J. Agric. Food. Chem. **2012**. 60 (16), 4126-4135.